

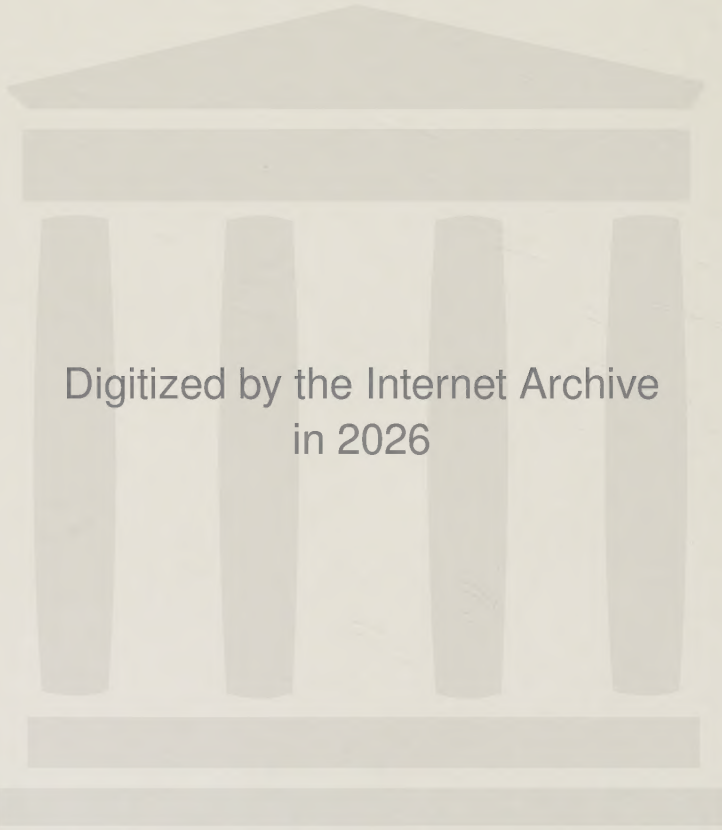
Anreicherung und Charakterisierung
der Phospholipase A
aus Serum von Intensivpatienten

Korbinian Brand

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546219_0028

Aus dem Institut für Klinische Chemie des
Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Guder

**Anreicherung und Charakterisierung
der Phospholipase A
aus Serum von Intensivpatienten**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Korbinian Brand

aus
München

Jahr
1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W.G. Guder

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. D. Inthorn
Prof. Dr. D. Neumeier

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. G.E. Hoffmann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.1988

M E I N E N E L T E R N

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. DEFINITION	1
1.2. PHYSIOLOGISCHE FUNKTION UND REGULATION DURCH NATÜRLICHE INHIBITOREN	3
1.3. PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER PHOSPHOLIPASE A	7
1.4. AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER PHOSPHOLIPASE A	9
1.5. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	11
2. PATIENTENGUT, MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. PATIENTENGUT	12
2.2. MATERIALIEN	13
2.2.1. BIOLOGISCHE MATERIALIEN	13
2.2.2. REAGENZIEN	13
2.2.3. GERÄTE	15
2.2.4. SONSTIGE MATERIALIEN	16

2.3. BESTIMMUNGSMETHODEN	16
2.3.1. PROTEIN	16
2.3.2. PHOSPHOLIPASE-A-AKTIVITÄT	18
2.3.2.1. PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG	18
2.3.2.2. MECHANISIERUNG DER PHOTOMETRISCHEN METHODE	21
2.3.2.3. ISOTOPENTEST	26
2.3.3. SONSTIGE METHODEN	27
2.4. METHODEN ZUR REINIGUNG DER PHOSPHOLIPASE A	28
2.4.1. FÄLLUNGSVERFAHREN	28
2.4.1.1. AMMONIUMSULFAT	28
2.4.1.2. SCHWEFELSÄURE	29
2.4.1.3. ACETON/METHANOL	29
2.4.2. EINENGUNGSVERFAHREN	30
2.4.2.1. ULTRAFILTRATION	30
2.4.2.2. LYOPHILISIEREN	30
2.4.2.3. DIALYSE GEGEN POLYÄTHYLENGLYKOL	30
2.4.3. CHROMATOGRAPHISCHE TRENNVERFAHREN	31
2.4.3.1. GELFILTRATION	31
2.4.3.2. IONENAUSTAUSCHER	32
2.4.3.3. HYDROPHOBE INTERAKTIONSCHROMATOGRAPHIE	33
2.5. REINHEITSPRÜFUNG MIT DER SDS-GELELEKTROPHORESE	34
2.6. DICHTEBESTIMMUNG MIT EINEM KONTINUIERLICHEN KALIUMBROMID-GRADIENTEN	35
2.7. QUALITÄTSKONTROLLE UND STATISTIK	35

3. ERGEBNISSE	36
3.1. ENZYMANREICHERUNG	36
3.1.1. FÄLLUNGSVERFAHREN	36
3.1.2. CHROMATOGRAPHISCHE TRENNVERSUCHE	38
3.1.3. EINENGUNGSVERFAHREN	50
3.1.4. KOMBINATION DER VERSCHIEDENEN SCHRITTE	52
3.2. CHARAKTERISIERUNG DER ANGEREICHERTEN PLA	55
3.2.1. MOLEKULARGEWICHT	55
3.2.2. PH-OPTIMUM	55
3.2.3. MESSUNG DER PLA ₂ -AKTIVITÄT	57
3.2.4. INHIBITOREN	58
3.2.5. TEMPERATUREINFLUSS	61
3.2.6. DICHTEBESTIMMUNG IM SERUM	61
3.3. KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN	63
3.3.1. PLA-MESSUNG BEI AUSGEWÄHLTEN KRANKHEITSBILDERN	63
3.3.2. CHARAKTERISIERUNG DER PLA AUSGEWÄHLTER PATIENTEN	68
4. DISKUSSION	70
4.1. METHODEN ZUR MESSUNG DER PHOSPHOLIPASE-A-AKTIVITÄT	70
4.2. MOLEKULARGEWICHT DER PHOSPHOLIPASE A IM SERUM	73

4.3. ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER SERUM-PLA - HINWEISE AUF DAS VORLIEGEN VON SUBPOPULATIONEN	76
4.4. PATHOPHYSIOLOGISCHE UND KLINISCHE ASPEKTE	81
5. ZUSAMMENFASSUNG	85
6. ANHANG	88
7. LITERATURVERZEICHNIS	95
8. DANKSAGUNG	107
9. LEBENSLAUF	108

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

D, kD	Dalton, Kilodalton
DTE	Dithioerythritol
E	Extinktion
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
HMW	high molecular weight
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
IgG	Immunglobulin G
LMW	low molecular weight
MG	Molekulargewicht
MW	Mittelwert
p.A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gradienten-Gel-Elektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyäthylenglycol
PLA	Phospholipase A
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
Vk	Variationskoeffizient



1. EINLEITUNG

1.1 DEFINITION

Als Phospholipasen bezeichnet man Enzyme, welche die Fähigkeit besitzen, Phospholipide zu spalten.

Das Gerüst der Phospholipide ist der dreiwertige Alkohol Glycerin. Zwei Hydroxylgruppen dieses Alkohols sind mit langkettigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren verestert, die dritte Hydroxylgruppe mit Phosphorsäure. Außer bei der Phosphatidsäure, dem einfachsten Vertreter der Phosphoglyceride, ist der Phosphatrest mit einem weiteren Alkohol verknüpft, so daß ein Phosphorsäurediester entsteht. Das häufigste natürliche Phospholipid ist das Phosphatidylcholin (Lecithin), das als Alkoholrest den Aminoalkohol Cholin besitzt und in pflanzlichen und tierischen Zellen als Hauptbaustein biologischer Membranen vorkommt (55).

Die Einteilung der Phospholipasen (PL) erfolgt nach ihren unterschiedlichen Angriffsstellen am Phospholipidmolekül (s.Abb.1). Von der Phospholipase A (PLA) werden Fettsäuren abgespalten, die Fettsäure in 1-Stellung von der PLA_1 , diejenige in 2-Stellung von der PLA_2 . Die PL C spaltet die Esterbindung zwischen Glycerin und Phosphorsäure, die PL D, besonders gut bei Pflanzen untersucht (100), die Bindung zwischen Phosphorsäure und dem weiteren Alkohol. Als Phospholipase B bezeichnete man früher das Enzym Lysophospholipase (100), das die zweite Fettsäure vom Lysophospholipidmolekül abspaltet (s.Abb.2). Lysophospholipide, wie z.B. Lysophosphatidylcholin, sind Phosphoglyceride, bei denen eine Fettsäure abgespalten ist (55).

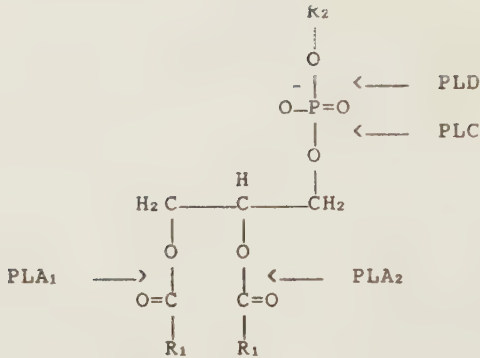


Abb.1: Verschiedene Angriffspunkte der Phospholipasen (PL)
 A_1 , A_2 , C und D am Phospholipid.
 R_1 = Fettsäurerest
 R_2 = Cholin, Ethanolamin, Inositol oder Serin

Phosphatidylcholin



Lysophosphatidylcholin



Glycerophosphorylcholin



Abb.2: Abbau der Phospholipide am Beispiel des Phosphatidylcholins (nach Löffler et.al. (55)).
 R_1 = Fettsäurerest

1.2. PHYSIOLOGISCHE FUNKTION UND REGULATION DURCH NATÜRLICHE INHIBITOREN

Die Phospholipasen sind im menschlichen Organismus ubiquitär zu finden und auch im gesamten Tier- und Pflanzenreich verbreitet (40,96). Beim Menschen unterscheidet man ein an Zell- und Organellenmembranen gebundenes Enzym und eine sekretorische Form, die aus intrazellulären Speicherorganellen ausgeschüttet wird und in verschiedenen Körpersäften wie z.B. Pankreassaft (20,26,27) oder Serum (61,95,96) nachweisbar ist.

Enzyme mit PLA-Aktivität besitzen wichtige Funktionen im Phospholipid-Turnover und in der intra- und transzellulären Signalübertragung (96). So ist z.B. die Arachidonsäure, eine ungesättigte Fettsäure, die vom C-Atom 2 des Phosphoglycerids abgespalten wird, eine Vorstufe in der Bildung von Prostaglandinen oder Leukotrienen (Abb.3) (55,100). Auch im Abwehrsystem des Körpers spielen Phospholipasen A eine wichtige Rolle. Freigesetzt aus Lysosomen von Abwehrzellen dienen sie zur Zerstörung der Membranen fremder Zellen wie z.B. Bakterien (40).

Schon im vorigen Jahrhundert beschrieb Bokay als erster den Lecithinabbau durch Pankreassaft (4).

Die ersten Messungen der PLA-Aktivität im Serum wurden 1960/61 von Vogel und Zieve durchgeführt (104).

1962 isolierten Magee et al. zum erstenmal PLA₂ aus humanem Pankreas (56). Dieses Enzym ist die am besten untersuchte Phospholipase des menschlichen Körpers (27,60, 86). Es besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 125 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 14 kD (98). Auffällig sind 7 Disulfidbrücken (98), die eine hohe Temperaturstabilität bedingen (s.Abb.4). PLA₂ kann mit nur

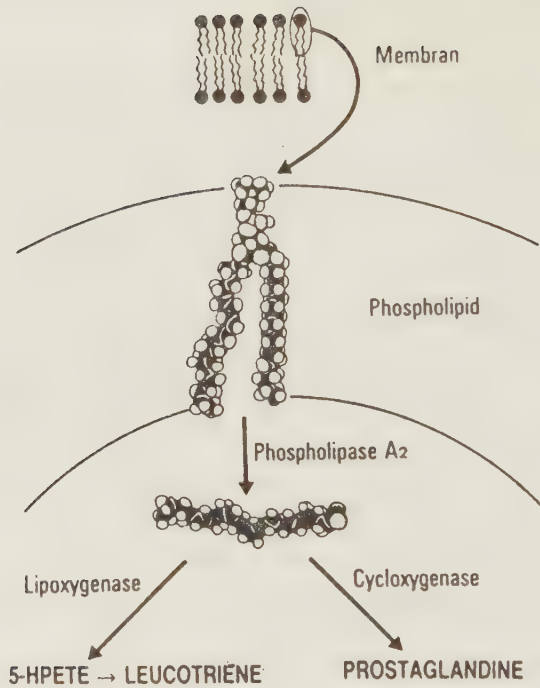


Abb.3: Abspaltung der Arachidonsäure als Vorstufe von Prostaglandinen und Leukotrienen durch Phospholipase A₂ (nach Russo-Marie (78)).

geringem Aktivitätsverlust in Schwefelsäure bei pH 3 bis 70 Grad erhitzt werden. Diese hohe Stabilität ist vermutlich für das Enzym nötig, um im aggressiven Milieu der Verdauungssäfte aktiv zu bleiben. Die PLA_2 des Pankreas wird in Zymogengranula als inaktives Proenzym gespeichert, während im Duodenum die Aktivierung durch Trypsin erfolgt (13,27, 60).

Phospholipasen aus anderen Organen sind noch lückenhaft untersucht, da diese Enzyme meist membrangebunden sind und aus dieser Bindung in aktiver Form nur schwer herausgelöst werden können (40).

1982 wurde von van den Bosch eine nicht hitzestabile PLA_2 aus Mitochondrien der Rattenleber gereinigt, die ansonsten zahlreiche Ähnlichkeiten mit dem Pankreasenzym aufweist (15).

In Leukozyten und Gewebsmakrophagen fanden sich ebenfalls Phospholipasen. Bisher wurden vor allem zwei Enzyme näher charakterisiert: eine membrangebundene PLA_2 , die Arachidonsäure abspaltet, und ein lysosomales Enzym, das vermutlich fremdes und untergegangenes Material zerstört (24, 102). Leukozyten und Gewebsmakrophagen besitzen, um sich von der destruktiven Wirkung der PLA zu schützen, Hemmstoffe, die als Macrocortin (21,22), Lipomodulin (1,34,35,77) oder Calpactin (11) bezeichnet werden.

Ähnliche Stoffe fand man auch in anderen Organen, so z.B. in der Niere als Renocortin (10,76) und in der Gebärmutter als Uteroglobulin (54). Die Synthese dieser Hemmstoffe unterliegt einer hormonellen Regulation durch Cortisol (64) bzw. Progesteron (54). Die physiologische Bedeutung dieser Mechanismen ist noch unzureichend erforscht.

1.3. PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER PHOSPHOLIPASE A

Enzyme mit PLA-Aktivität besitzen bei einer großen Anzahl von Erkrankungen eine pathophysiologische und klinische Bedeutung.

Ein gesteigerter Phospholipidabbau durch erhöhte PLA-Aktivität und damit eine Erhöhung der Lysolecithinkonzentration wird für die Arrhythmie beim Herzinfarkt verantwortlich gemacht (9,87). Im Tierversuch zeigte sich ein kardioprotektiver Effekt von Macrocortin, einem PLA-Inhibitor (96). Bei einer anderen ischämischen Erkrankung, dem cerebralen Insult, konnte ebenfalls eine PLA-Aktivierung beobachtet werden (16).

Auch eine Erniedrigung der Konzentration von intrazellulären Inhibitoren kann zu einer Erhöhung der PLA-Aktivität führen. So fanden sich bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus erythematoses oder primär chronische Polyarthrits Antikörper gegen Lipomodulin (34). Im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden erhöhte PLA-Aktivitäten gemessen (71).

Bei einer Reihe von Medikamenten wie Malariamitteln, Neuroleptika, Aminoglykosidantibiotika oder β -Blockern kann es zu medikamentös induzierten Lipoidosen durch eine intrazelluläre PLA-Hemmung kommen (45). Durch Diäthylaminoäthoxy-Hexöstrol, einer gefäßerweiternden Substanz, wird die Phospholipase A und C gehemmt, wobei z.B. in der Leber der Lecithingehalt ungefähr auf das Doppelte des Kontrollwertes ansteigt (103).

Bei anderen Krankheitsbildern scheint eher die sekretorische PLA eine Rolle zu spielen.

So wurden erhöhte PLA-Werte bei Pankreatitis, besonders bei der nekrotisierenden Verlaufsform (82), beim ARDS ("adult respiratory distress syndrome") (63) und beim gram-negativ septischen Schock (95) beschrieben. Im Tierexperiment führte die Gabe von PLA-Hemmstoffen bei Pankreatitis zu einer Besserung des Krankheitsverlaufs (81,105). Bei Patienten mit akuter Pankreatitis war bei Verabreichung von $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$ -Infusionen ein Abfall der Serum-PLA und eine klinische Besserung zu beobachten (96).

Auch Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, PLA auszuscheiden. Als Beispiel sei *Pneumocystis carinii* genannt, der Erreger der interstitiellen Pneumonie, die vor allem bei Säuglingen oder Erwachsenen mit Immundefekten wie z.B. AIDS auftritt (45). Sowohl bei der interstitiellen Pneumonie als auch beim oben erwähnten ARDS kommt es vermutlich durch PLA zu einer Zerstörung des Lungensurfactants, der einen hohen Phospholipidgehalt besitzt (40).

Die Gifte einiger Insekten wie z.B der Biene (84) sowie einige Schlangengifte (45) enthalten ebenfalls PLA_2 . Bei Schlangenbissen kommt es durch PLA-Wirkungen vor allem an den Nervenendigungen zur Atemlähmung durch Hemmung der Zwerchfellerregung, weiter zur Hämolyse, Muskelzerstörung und zum Kreislaufversagen (45).

1.4. AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER PHOSPHOLIPASE A

In den letzten Jahren erschienen eine Reihe von Publikationen von Methoden für die Bestimmung der PLA-Aktivität, die teilweise sehr aufwendig und daher für Routinezwecke weniger geeignet sind (s.a.Kap.4.1.). Einen kurzen Überblick über die wichtigsten Verfahren gibt Tabelle 1.

Ausgehend von der Entwicklung einer optisch-enzymatischen Methode zur Bestimmung der Serumlipase (39) entwickelten Hoffmann et.al. 1985 im Institut für Klinische Chemie des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen einen photometrischen vollenzymatischen Test zur Bestimmung der PLA-Aktivität (38,41,42). Dieser Test wurde später modifiziert und verbessert (43) und auch für eine vollautomatische Bestimmung adaptiert (50). Einen ähnlichen Test publizierte 2 Jahre später auch eine finnische Arbeitsgruppe (46). Mit der photometrischen Methode wurde die klinische Bedeutung erhöhter PLA-Werte im Serum bei pankreatischen (37,38, 79,80) und extrapankreatischen Krankheitsbildern wie Sepsis (51), Lungenversagen (52) oder Autoimmunerkrankungen (31) untersucht.

Erstautor	Jahr	Substrat	Meßprinzip
Zieve (104)	1961	Phosphatidylcholin	Titration
De Haas (12)	1968	Eidotter	Titration
Figarella (20)	1971	Eidotter	Titration
Elsbach (17)	1979	Radioaktiv markierte Bakterienstämme	Isotopentest
Shakir (83)	1981	Radioaktiv markierte PC-Emulsion	Isotopentest
Grataroli (27)	1982	Dioctanoyl-PC	Titration
		Synthetische Phospholipidanaloga	Photometrische Methode
Nishijima (62)	1983	-	Radioimmunoassay
Eskola (19)	1983	-	Fluoreszenz-Immunoassay
Hendrickson (30)	1983	Synthetische PC-Analoga	Photometrische Methode
Thuren (93)	1985	Synthetische PC-Analoga	Fluorometrische Methode
Hoffmann (38)	1985	Phosphatidylcholin-Emulsion	Photometrische Methode

Tab.1: Übersicht über Methoden zur Bestimmung der PLA-Aktivität und Enzymkonzentration.

PC = Phosphatidylcholin

1.5. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Reinigung der Phospholipase A aus Serum von Intensivpatienten mit Fällungs- und Chromatographieverfahren. Das angereicherte Enzym sollte hinsichtlich Reinheit, Molekulargewicht, pH-Optimum, Einfluß von Inhibitoren etc. näher charakterisiert werden. Der vorwiegend in dieser Arbeit verwendete Test zur Bestimmung der Phospholipase-A-Aktivität nach Hoffmann et al. (42,43) sollte optimiert und als halbmechanisierte Version adaptiert werden.

Eine weitere Aufgabenstellung war die diagnostische Erprobung dieses Tests bei schweren Krankheitsbildern der Intensivmedizin und bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Am Beispiel dieser Erkrankungen sollte geprüft werden, ob die im Serum meßbare Enzymaktivität einer bestimmten Organquelle zugeordnet werden kann und ob eine oder mehrere PLA-Formen im Serum vorliegen.

2. PATIENTENGUT, MATERIAL UND METHODEN

2.1. PATIENTENGUT

Zur Anreicherung und Charakterisierung wurden vorwiegend Seren von Patienten der anästhesiologischen Intensivstation (Chefarzt Prof. Dr. Landauer) des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen verwendet, die im Rahmen der Intensivüberwachung eingesandt worden waren.

In diesen Seren wurde mit dem Selektivanalyzer Kone Progress die PLA-Aktivität bei pH 6,5 und pH 8.0 gemessen. Seren mit Aktivitäten über 40 U/l wurden in drei verschiedenen Pools eingefroren. Dabei bestimmte der Quotient der Aktivität bei pH 8.0 zur Aktivität bei pH 6.5 die Zuteilung zu diesen drei Pools. Seren mit Quotienten über 1,5 kamen in den sog. "alkalischen", Seren mit Quotienten unter 0,7 in den "sauren", der Rest in einen "neutralen" Pool. Nach dem Wiederauftauen wurden diese Pools sorgfältig gemischt und unlösliche Niederschläge abzentrifugiert (10 min bei 1500 * g). Bei allen Patienten mit Enzymaktivitäten über 100 U/l wurde der klinische Verlauf und weitere klinisch-chemische Meßgrößen untersucht (s. Kap.3.3.1. u. Anhang). Einige dieser Seren wurden auch teils frisch, teils nach Einfrieren als Einzelproben weiterverarbeitet.

Seren von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen stellten uns freundlicherweise Herr PD Dr. Meurer aus dem immunpathologischen Labor der Dermatologischen Universitätsklinik, München (Ärztl. Direktor Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Braun-Falco) und die II. Medizinische Abteilung des Städtischen Krankenhauses Bogenhausen (Chefarzt Prof. Dr. Kaess) zur Verfügung (s. Kap.3.3.1.).

2.2. MATERIALIEN

2.2.1. BIOLOGISCHE MATERIALIEN

Prof. Dr. T. Nevalainen, Pathologische Abteilung der Universität Turku, Finnland, stellte uns freundlicherweise ein Antikörperkonzentrat gegen humane Pankreas-PLA₂ zur Verfügung, das von Schafen gewonnen wurde.

2.2.2. REAGENZIEN

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden, alphabetisch geordneten Firmen bezogen.

AMERSHAM, Braunschweig:

1-Palmitoyl-2-[1-¹⁴C]Linoleoyl-L-3-Phosphatidylcholin,
1-Palmitoyl-2-[1-¹⁴C]Linoleoyl-L-3-Phosphatidylethanolamine
(Substrat für Isotopentest)

BEHRING, Marburg:

Seroquant-A (Kontrollserum), Beriglobin (humanes IgG)

BIO-RAD, Anaheim, California:

Total Protein Test (Coomassie-Blau-Methode)

BOEHRINGER, Mannheim:

Trichloressigsäure p.A.,
Biuretreagenz No.704105 und Cholesterinreagenz No.704121
(Testsätze für Analysengerät Hitachi 705),
Kalibrationsserum No.759350 (Cholesterinstandard)
PLA-Substrat (Phosphatidylcholin),

FISCHAR, Scheidt/Saar:

Aceton

LKB, Grärfelfing:

Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) 99%

MERCK, Darmstadt:

Kaliumcyanid, TRIS(hydroxymethyl)-aminosäuren Natriumchlorid, Salzsäure 25%, Calciumchlorid-Dihydrat, Ammoniumsulfat, Schwefelsäure 95-97%, Natriumhydroxid, D(-)-Mannit, Triton X-100, Natriumacetat-Trihydrat, Titriplex III(EDTA), Kaliumdihydrogenphosphat, di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Methanol, Chloroform, Essigsäure (Eisessig), Kaliumchlorid, Kaliumbromid (alle Reagenzien in p.A.-Qualität), Natriumdesoxycholat, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Dünnschichtchromatographie-Fertigplatte mit Konzentrierungszone)

MERCK-SCHUCHARDT, Hohenbrunn bei München:

Maleinsäure und 2-Mercaptoäthanol p.A.

AHS-MÜNCHEN, München:

Lab-trol-E (Kontrollmaterial auf Humanserumbasis)

ORION, Helsinki, Finnland:

Albumin-Antiserum

PHARMACIA, Freiburg:

Gel Filtration Calibration Kit (Proteinstandard mit Eichproteinen von 13,7-67 kD [LMW] und 158-669 kD [HMW]), Sephadex G-25 M, G-50 M, G-100 und G-150 (Molekularsieb), CM-Sephadex CL-6B (Kationenaustauscher), Octyl-Sepharose CL-4B (hydrophobe Chromatographie), Calibration Kit für Elektrophorese (Proteinstandard mit Eichproteinen von 14,4-94 kD [LMW] und 67-330 kD [HMW]), PhastGel Gradient 8-25 (SDS-Gelelektrophorese)

ROTH, Karlsruhe:

Glycerin 86% p.A.

SERVA, Heidelberg:

Dithioerythritol p.A., Polyäthylenglycol 6000, Desoxycholsäure

TECHNICON, Bad Vilbel:

Albumin-Kit (RA-1000)

WAKO-CHEMICALS, Düsseldorf:

NEFA-C-Test (Testsatz zur Bestimmung freier Fettsäuren)

2.2.3. GERÄTE

Die Firmennamen sind alphabetisch geordnet.

AMICON, Limerick, Ireland:
Ultrafiltrationsgerät

BECKMAN, München:
Spektralphotometer DU-7, ICS Analyzer II

BENDER u. HOBEIN, München:
Vortex-Mischer

BERTHOLD, Wildbad:
Automatic TLC-Linear-Analyzer (Scanner)

BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim:
Analysengerät Hitachi 705

CHRIST, Osterode:
Lyophilisator BETA I

EPENDORF, Hamburg:
Tischzentrifuge und Schüttler (Einbaueinheit 3901), Spek-
trallinien-Filterphotometer 1101M mit Hg-Lampe, Flammenpho-
tometer AFM 5051, Chloridmeter 6610, Schlauchpumpe 5260

HERAEUS-CHRIST, Osterode:
Zentrifuge Varifuge K

HETTICH, Tuttlingen:
Zentrifuge Rotixa/K

KONE, Finnland:
Selektives Mehrkanalanalysengerät Progress

LKB, Grärfelfing:
2132 Microperplex Peristalticpumpe, 2111 Multirac Frak-
tionssammler

METTLER, Giessen:
Magnetrührer LR 11, Waagen PE 2000 und AE 160

PHARMACIA, Uppsala, Schweden:
PhastSystem (Elektrophorese)

RADIOMETER, Kopenhagen, Dänemark:
Research-pH-Meter PHM 84

DU PONT, Bad Nauheim:
RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge,
Ultrazentrifuge OTD 65 B

TECHNICON, Bad Vilbel:
Analysengerät RA-1000

VOGEL, Giessen:
Osmometer OM 801

2.2.4. SONSTIGE MATERIALIEN

AMICON, Limerick, Ireland:
Diaflo Ultrafiltrations-Membranen PM 10 und XM 50
PHARMACIA, Uppsala, Schweden:
Probenapplikator 8/1, SDS-Pufferstreifen

2.3. BESTIMMUNGSMETHODEN

2.3.1. PROTEIN

Ein Teil der Proteinbestimmungen wurde mit der Biuretmethode (36,92) durchgeführt. Peptidbindungen bilden mit Kupfersalzen eine Komplexverbindung, deren Farbintensität der Proteinkonzentration proportional ist (55). Die Messung der Extinktion erfolgte bei 546 nm. Durch Zugabe von Cyanidionen wird der Kupfer-Protein-Komplex zerstört, und es bildet sich farbloses Kupfercyanid, dessen Extinktion als Probenleerwert dient.

Zu 500 µl Probe wurden 100 µl Trichloressigsäure (0,4 mol/l) gegeben. Die Lösung wurde 1 min auf dem Schüttler gemischt, 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen, 2 min bei 8000 * g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das

Präzipitat wurde mit 1000 µl Biuretreagenz durch Mischen mit einem Kupferdraht (1-2 min) vollständig aufgelöst und 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde die Extinktion (E_{Pr}) mit dem Eppendorfphotometer gegen Wasser bei 546 nm gemessen. Nach Zugabe von 50 µl Kaliumzyanid (1 mol/l) entfärbte sich die Lösung (E_1). Die Extinktion der Biuretlösung ergab E_2 . Wie mit der Probe wurde auch mit einem 1:51 mit 0,9% Natriumchloridlösung verdünnten Proteinstandard Labtrol (Ausgangskonzentration 73,3 g/l) verfahren (E_{s1} , E_{s11} , E_{s12}). Die Proteinkonzentration ergab sich dann aus folgender Formel:

$$\frac{E_{Pr} - (E_1 + E_2)}{E_{s1} - (E_{s11} + E_{s12})} * 1437 = \text{Protein [mg/l]}$$

Einige Proteinbestimmungen erfolgten mit der Methode nach Bradford (5,74). Durch Bindung an Coomassie Brilliant Blau verschieben Proteine, die bestimmte geladene oder aromatische Aminosäuren enthalten, das Absorptionsspektrum des Farbstoffes im langwellig sichtbaren Bereich um 595 nm nach oben.

Verwendet wurde die Testkombination "Total Protein Test" von BIO - RAD. 15 ml Reagenz wurden mit 60 ml destilliertem Wasser verdünnt und durch Filterpapier filtriert. Der Standard Labtrol wurde 1:101 mit 0,9% NaCl verdünnt.

Zu 1 ml Reagenz wurden 20 µl Probe bzw. Standard pipettiert. Der Leerwert ergab sich, indem Wasser statt Probe zugegeben wurde. Die Lösung wurde 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde innerhalb von 60 min die Extinktion (E) bei 595 nm mit dem Eppendorfphotometer gemessen. Berechnung der Proteinkonzentration:

$$\frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} * 726 = \text{Protein [mg/l]}$$

2.3.2. PHOSPHOLIPASE-A-AKTIVITÄT

2.3.2.1. PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG

Die Aktivität wurde mit einem vollenzymatischen Test nach Hoffmann (41,42,43) bestimmt.

Als Substrat diente eine lyophilisierte rekonstituierbare Phosphatidylcholin-Emulsion von Boehringer Mannheim (43). Sie wurde in 5 ml TRIS-HCl-Puffer (0,1 mol/l, pH 8,0, mit 4 mmol/l CaCl_2) bzw. TRIS-Maleat-Puffer (0,1 mol/l, pH 6,5, mit 4 mmol/l CaCl_2) gelöst und 30 min durch Rollen vorsichtig gemischt.

Freigesetzte Fettsäuren wurden mit dem NEFA-C-Test von Wako Chemicals photometrisch gemessen (101). Reagenz A und B wurden nach Anleitung des Herstellers aufgelöst.

Reagenz A enthielt:

Acyl Coenzym A Synthetase (ACS)
Ascorbat Oxidase (AOD)
Coenzym A (CoA)
Adenosintriphosphat (ATP)
4-Aminoantipyrin (AAP)

Reagenz B enthielt:

Acyl Coenzym A Oxidase (ACOD)
Peroxidase (POD)
3-methyl-N-ethyl-N-(β -hydroxyethyl) anilin (MEHA)

Eine 2-Punkt-Messung ermittelte die Aktivität:

Bei einer Temperatur von 37 °C wurden Probe und Substrat-emulsion in getrennten Ansätzen je 3 min (Reihe 1) bzw. 18 min (Reihe 2) inkubiert. Nach Zugabe der Reagenzien NEFA-A und -B bildete sich ein violetter Farbstoff, dessen Extinktion bei 546 nm Wellenlänge gemessen wurde (s. Abb.5).

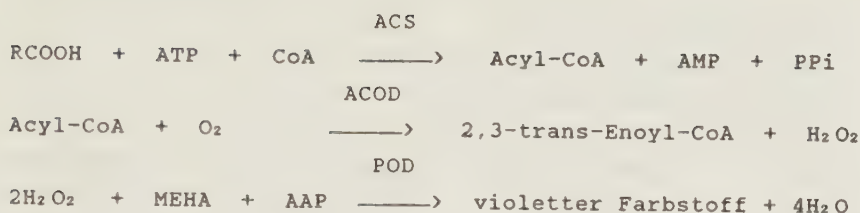


Abb.5: Reaktionsprinzip der photometrischen Methode.

RCOOH = nicht veresterte freie Fettsäure

AMP = Adenosinmonophosphat

PPi = Pyrophosphat

Sonstige Abkürzungen s. Text

Reihe 1: Zugabe von 0,02 ml Probe

Reihe 2: Zugabe von 0,4 ml NEFA A

Reihe 1: Zugabe von 0.12 ml Substrat, mischen
(Reaktionsstart)

Reihe 1: Nach 3 min Überführung von genau 0.07 ml in Reihe 2

Reihe 2: Nach 5 min Zugabe von 0,8 ml NEFA B, mischen (E₃)

Reihe 1: 18 min nach Reaktionsstart Zugabe von 0,4 ml NEFA A, mischen

Reihe 1: Nach weiteren 5 min Zugabe von 0,8 ml NEFA B, mischen (E₁₈)

Nach weiteren 5 min wurde mit dem Eppendorffphotometer die Extinktion (E) gegen Wasser bei 546 nm gemessen.

Tab.2: Analysengang der Handmethode zur PLA-Aktivitätsmessung.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über den Analysengang bei manueller Testdurchführung.

Folgende Formel ergab die Aktivität:

$$(E_{18} - E_3) * 450 = \text{PLA [U/l]}$$

Davon wurde der Wasserwert abgezogen (Wasser statt Probe), Aktivitäten unter 10 U/l wurden nur semiquantitativ ausgegeben (< 10 U/l).

Zur Kontrolle des NEFA-C-Reagenz diente ein Ölsäurestandard: Zu 0,04 ml Ölsäurestandard (1 mmol/l) wurden bei 37 °C 0,25 ml NEFA-Reagenz A und nach 5 min 0,5 ml NEFA-Reagenz B gegeben. Nach weiteren 5 min wurde die Extinktion gegen Wasser gemessen: Ölsäure (mmol/l) = $E * 1,282$
Bei Abweichungen von mehr als 10% vom Sollwert wurde die Meßreihe wiederholt.

Bei jeder Meßserie wurde als Kontrolle ein Serum aus dem "neutralen" Pool mit bekannter Aktivität von etwa 70 U/l mitgeführt. Weiterhin wurde in einem Serum aus diesem Pool mit der Handmethode die Aktivität bei pH 8,0 gemessen und die Präzision in Serie und von Tag zu Tag (n = 10) errechnet. Für die Bestimmung von Tag zu Tag wurde Serum nach gutem Mischen auf 10 Portionen von je 0,2 ml verteilt und eingefroren. Es ergaben sich folgende Werte:

Präzision in Serie:

MW : 79 U/l

SD : 6 U/l

Vk : 7,6 %

Präzision von Tag zu Tag:

MW : 80 U/l

SD : 9 U/l

Vk : 11,3 %

2.3.2.2. MECHANISIERUNG DER PHOTOMETRISCHEN METHODE

Zur Messung der PLA in größeren Serien wurde die manuelle Testvorschrift (s.Kap.2.3.2.1.) auf den Selektivanalyser Kone Progress der Firma Kone für eine vollmechanisierte Bestimmung adaptiert (50). 2 µl Probe wurden zu 12 µl Substratemulsion gegeben und bei 37 °C in zwei getrennten Küvetten inkubiert. Nach 203 und 1056 sec wurden die Konzentrationen der freigesetzten Fettsäuren mit dem oben beschriebenen photometrischen Test gemessen. 76 µl Farbreagenz A und 5 min später 150 µl Farbreagenz B wurden zugegeben, die Extinktionen nach 5 min bei 540 nm gemessen und die Enzymaktivitäten durch die Differenzbildung der zwei Fettsäurekonzentrationen berechnet. Als Standard wurde der im Test enthaltene Ölsäurestandard verwendet. Die spontane Hydrolyse der Substratemulsion wurde mit einem Leerwert (Wasser als Probe) überprüft. Abbildung 6 zeigt ein Parameterprotokoll dieser vollmechanisierten Bestimmungsmethode.

Auch für diese Meßmethode wurde die Präzision in Serie und von Tag zu Tag mit einem Serum mittelgradig erhöhter Aktivität aus dem "neutralen Pool" bestimmt (n=10):

Präzision in Serie:

MW : 56 U/l
SD : 3 U/l
Vk : 5,4 %

Präzision von Tag zu Tag:

MW : 57 U/l
SD : 5 U/l
Vk : 8,8 %

Allgem. Parameter PLA1/PLA4

Test Kurzname	PLA1/PLA4
Test Identifik.	PLA1/PLA4
Test Gruppe	1
Proben - Typ	S
Einheit	U/l
Anzahl Dezimalstellen	1
Photometrie/Elekt. (P/E)	P
Automat. Akzept. (J/N)	J

Kalibration PLA1/PLA4

Lin. (1) Leerw. (2) N.lin. (3)	1
Einf./dopp. Stds (E/D)	E
Kalibr. wiederh. n. min.	60
Faktor	875.9
Leerwert	0.000
Lin. Konzent. achse (J/N)	J
erl. Fehler, absol. (mE)	2000
erl. Fehler, relat. (%)	0
erl. Kal. Diff. 1 (min/max)	*/*
erl. Kal. Diff. 2 (min/max)	*/*
Automat. Akzept. (J/N)	N
m. Leerw. - Korr. (J/N)	N

Grenzwerte PLA1/PLA4

Restl. Ext. diff. (bichrom.)	0.000
Anf. ext. (min/max)	-0.050/2.000
erl. Nichtlin. (%)	0
erl. N.lin. (Konz. Diff.)	0.0

Testabl./Pipett. PLA1/PLA4

Probe m. Wass./Reag. (W/R)	R
Probe m. Reag. N. (1-4)	1
Waschlös. f. Probe (1-24)	0
Probe - Volumen (µl)	2.0
Vol. bei autom. Verdünn.	1.0

Reagenz-Position (1-24)	14
Reagenz-Volumen (µl)	12

-mit Nadelmischen (J/N)	J
m. Synchronisation (J/N)	J
Anschl. Mixzeit (s)	0
Inkubationszeit (s)	203 (PLA1)
	1056 (PLA4)
Anschl. Mixzeit (s)	10

Waschlös. Reag. 2 (0-24)	-1
Anschl. Mixzeit (s)	0
Reagenz-Position (1-24)	15
Reagenz-Volumen (µl)	76
Einf. -/mehrf. ansaugen (E/M)	E
-mit Nadelmischen (J/N)	J
m. Synchronisation (J/N)	N
Anschl. Mixzeit (s)	0
Inkubationszeit (s)	300
Anschl. Mixzeit (s)	10
Waschlös. Reag. 3 (0-24)	-1
Anschl. Mixzeit (s)	0
Reagenzposition (1-24)	16
Reagenz-Volumen (µl)	150
Einf. -/mehrf. ansaugen (E/M)	E
-mit Nadelmischen (J/N)	J
m. Synchronisation (J/N)	N
Anschl. Mixzeit (s)	0
Inkubationszeit (s)	300
Anschl. Mixzeit (s)	10

Testabl./Messung PLA1/PLA4

Temperatur (C)	37
Wellenlänge (nm)	540
Seitenwellenlänge (nm)	0
Fakt. d. Seitenw. länge	1.000
EP (1), 2-Punkt (2), Kin (3)	1
Messzeit (s)	0
Ext. Zunahme/Abn. (Z/A)	Z
Blank mit Wasser (J/N)	J
EP/Kin. Blankmess. (E/K)	E

Abb. 6: Parameterprotokoll der vollmechanisierten Bestimmung der PLA-Aktivität mit dem Selektivanalyzer Kone Progress (Der NEFA-C-Test zur Überprüfung der Bestimmung von freien Fettsäuren wurde nicht dargestellt).

Da nicht alle handelsüblichen Analysengeräte für die oben beschriebene Adaption geeignet sind, wurde die Handmethode (s. Kap.2.3.2.1.) für eine halbmechanisierte Bestimmung so modifiziert, daß die Inkubation von Enzym und Substrat manuell erfolgt und die Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren mit einem Analysengerät durchgeführt werden kann.

Als Substrat wurde die oben angegebene Phosphatidylcholin-Emulsion von Boehringer Mannheim verwendet. Der bereits in der Originalmethode (42) beschriebene Phosphatpuffer (0,05 mol/l pH 5,5) mit EDTA (6 mmol/l) diene als Stoppreagenz. Der schon mehrmals erwähnte NEFA-C-Test von Wako Chemicals wurde auch hier zur Bestimmung der freien Fettsäuren eingesetzt, doch könnten grundsätzlich auch andere mechanisierte Fettsäuretests verwendet werden.

Zu 0,5 ml Substratemulsion wurden 50 µl Probe pipettiert. Der Ansatz wurde gemischt und bei 37 °C inkubiert. Nach 3 min bzw. 18 min wurden davon je 200 µl zu je 200 µl vorgelegtem Stoppreagenz gegeben. Wiederum wurde der Ansatz gemischt und dann kaltgestellt.

Für Routinezwecke könnte nun die Bestimmung der von der PLA in diesen 15 min freigesetzten Fettsäuren von einem vollautomatischen Analysengerät durchgeführt werden (s.u.). Bei der Entwicklung dieser Methode wurde die Fettsäurebestimmung manuell wie folgt durchgeführt.

Zu zweimal je 100 µl (Doppelbestimmung) des kaltgestellten Ansatzes wurden 0,5 ml NEFA A gegeben. Nach weiteren 5 min wurde 1 ml NEFA B dazugegeben und die Extinktion bei 546 nm gemessen.

Die Aktivität errechnete sich aus folgender Formel:

$$(E_1 - E_3) * 1524 \quad [U/l]$$

Wie bei der Handmethode wurden ein Leerwert (Wasser statt Probe), Kontrollserum und Ölsäurestandard mitbestimmt.

Bei der Entwicklung dieser für eine halbmechanisierte Bestimmung gedachten Methode wurden bei noch manueller Fettsäurebestimmung einige Untersuchungen zur Linearität, Präzision und zur Korrelation mit der üblicherweise verwendeten manuellen PLA-Aktivitätsmessung (s.Kap.2.3.2.1) durchgeführt.

Die Messungen wurden, wie oben angegeben, durchgeführt und die Extinktion bei 546 nm nach 3, 8, 13, 18 und 23 min bestimmt. Abbildung 7 zeigt eine lineare Zunahme der Extinktion und damit einen linearen Anstieg der Konzentration an freigesetzten Fettsäuren in einem Zeitintervall von 0 - 23 min.

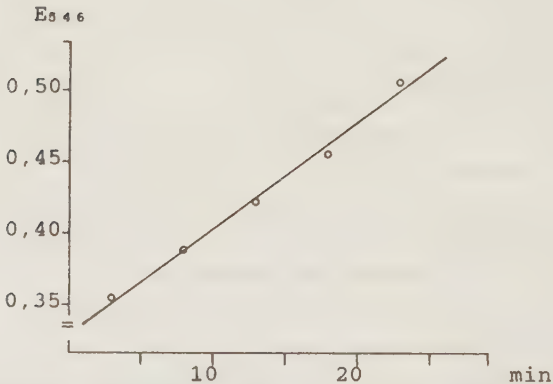


Abb.7: Linearität der modifizierten photometrischen Bestimmungsmethode (Doppelbestimmung).

Die Präzision in Serie wurde mit einem Serum mittelgradig erhöhter Aktivität ($n = 10$) bestimmt. Der Mittelwert betrug 62 U/l und die Standardabweichung 4 U/l. Daraus errechnete sich ein Variationskoeffizient von 6,5%.

Weiterhin wurde die PLA-Aktivität in Seren mit unterschied-

lichen Konzentrationen mit der manuellen und der modifizierten photometrischen Methode bestimmt (Abb. 8). Beide Methoden zeigten übereinstimmende Ergebnisse. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,984$ ($n = 10$).

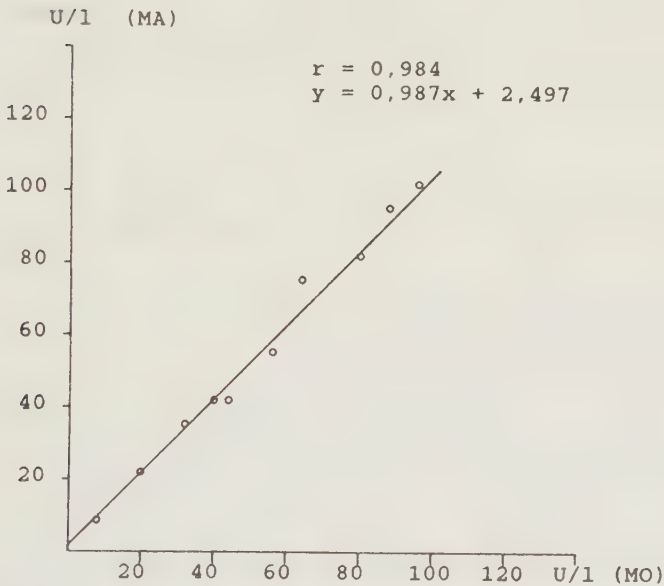


Abb.8: Korrelation zwischen manueller (MA) und modifizierter (MO) photometrischer Methode.

Für die mechanisierte Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren sind z.B die Analysengeräte Hitachi 705 (Boehringer Mannheim), RA-1000 (Technicon) und Kone Progress (Kone) geeignet. Für den RA-1000 ist das Farbreagenz A entgegen der Originalvorschrift von Wako in 24 ml, das Farbreagenz B in 9 ml Solvens zu lösen (32).

2.3.2.3. ISOTOPENTEST

Um neben der gesamten PLA-Aktivität auch den A₂-Anteil selektiv fassen zu können, wurde ein Isotopentest durchgeführt (70).

Als markierte Substrate wurden 1-Palmitoyl-2-[1-¹⁴C] Linoleoyl-Phosphatidylcholin (PC) und 1-Palmitoyl-2-[1-¹⁴C] Linoleoyl-Phosphatidylethanolamin (PE) von Amersham verwendet. Das unmarkierte Substrat stammte wiederum von Boehringer Mannheim.

0,6 µCi PC/PE (1:1,9) wurden nach Trocknen unter einem Stickstoffstrom in 50 µl Tris-HCl-Puffer (0,1 mol/l pH 8,0 mit Desoxycholat 25 mmol/l) aufgelöst. Dann wurden 5 ml Tris-HCl-Puffer (0,1 mol/l pH 8,0 + 4 mmol/l Ca²⁺) zugegeben und damit das unmarkierte Substrat aufgelöst. Die PC- und PE-Konzentration betrug 8 bzw. 10 mmol/l.

Je 0,3 ml Substrat wurden bei 37 °C mit 0,3 ml Probe inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten (6,30,60,120 min) wurden je 100 µl Ansatz (Dreifachbestimmung) mit 10 µl HCl (1 mol/l) gestoppt. Nun wurden 0,5 ml einer Chloroform/Methanol/Eisessig-Lösung (2:1:0,05) und 50 µl KCl zur Erleichterung der Phasentrennung dazugegeben und das Ganze 1 min bei 3000*g zentrifugiert. Die Chloroform-Phase wurde abpipettiert, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 20 µl Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen. Diese Lösung wurde nun auf eine Kieselgelplatte aufgetragen, die mit Chloroform/Methanol/Wasser (69:27:4) entwickelt wurde. Die Dünnschichtchromatographie trennt die abgespaltenen Fettsäuren von nicht umgesetztem Substrat aufgrund unterschiedlicher Polarität, da die nicht umgesetzten Phospholipide zur stationären Phase (Wasser), die freigesetzten Fettsäuren zur mobilen Phase (wasserhaltiges

organisches Laufmittel) eine größere Affinität besitzen (55). Anschließend wurde mit dem Scanner die aufgetrennte Radioaktivität ermittelt und daraus die Menge der freigesetzten Fettsäuren (FS) mit folgender Formel bestimmt:

FS [μmol] = Fraktion der FS * μmol Substrat/Ansatz

Unter Einbeziehung der Inkubationszeit (IZ) errechnete sich anschließend die PLA₂-Aktivität wie folgt:

$$\text{PLA}_2 \text{ [U/l]} = \text{FS} * \frac{20000}{\text{IZ}}$$

2.3.3. SONSTIGE METHODEN

Die enzymatische Cholesterinbestimmung (CHOD-PAP-Methode von Boehringer Mannheim) in Säuleneluaten wurde nach den Angaben des Herstellers (Beipackzettel 1986) durchgeführt, jedoch mit 10-fachem Probeneinsatz:

Zu 1 ml Cholesterin-Reagenz von Boehringer Mannheim wurde bei 37 °C 100 μl Probe gegeben. Die Lösung wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 546 nm gemessen (E_{Pr}). Der Cholesterin-Standard (165 mg/dl) wurde 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und mitbestimmt (E_{St}). Die Cholesterinkonzentration errechnete sich dann aus der Formel wie folgt:

$$\frac{E_{Pr}}{E_{St}} * 33 = \text{Cholesterin [mg/dl]}$$

Eine nephelometrische IgG-Bestimmung wurde am Auto-ICS-Analyzer II von Beckman nach Angaben der Firma durchgeführt (Beckman Instructions IgG 1986).

Die immunturbidimetrische Albuminbestimmung erfolgte mit

Reagenzien der Firma Orion am Selektivanalyzer Kone Progress (44). Am Selektivanalyzer RA-1000 von Technicon wurde Albumin mit Bromcresolgrün bestimmt (Methodenblatt Albumin von Technicon 1983), die NaCl-Konzentration wurde am Flammenphotometer AFM 5051 von Eppendorf gemessen (Bedienungsanleitung AFM 5051 1979).

2.4. METHODEN ZUR REINIGUNG DER PHOSPHOLIPASE A

2.4.1. FÄLLUNGSVERFAHREN

2.4.1.1. AMMONIUMSULFAT

Ammoniumsulfat fällt Proteine durch Entzug der Wassermoleküle (55). Die Fällung ist vom isoelektrischen Punkt, der Molekülgröße und der Hydrophobizität des jeweiligen Proteins abhängig.

Ammoniumsulfat wurde mit dem Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben und dem Material unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer bis zur gewünschten Konzentration vorsichtig zugegeben. Verwendet wurden Ammoniumsulfat-Konzentrationen von 114-472 g/l (20-70 % Sättigung). Nach der Zugabe wurde die Lösung weitere 30 min gerührt. Diese Schritte wurden teils bei Zimmertemperatur, teils bei 4 °C durchgeführt. Danach wurde das Material 30 min bei 15000 * g zentrifugiert und der Bodensatz mit TRIS-HClPuffer (10-20 mmol/l, pH-Bereich: 7.5-8,4) in einem im Vergleich zum Anfangsvolumen kleineren Volumen aufgelöst. Da Ammoniumsulfat die

Aktivitätsmessungen störte (88), wurden aufgelöster Bodensatz und Überstand über Nacht im Kühlraum gegen 100 Volumina des gleichen Puffers dialysiert.

2.4.1.2. SCHWEFELSAURE

Das Serum wurde durch tropfenweises Zugabe von H_2SO_4 (0,5 mol/l) unter ständigem Mischen auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Die Endkonzentration von Schwefelsäure betrug 65 mmol/l. Das angesäuerte Material wurde 10 min stehen gelassen und dann im Wasserbad bei 56 °C bis 50 °C erhitzt. Es entstand ein weiches Gel, das 10 min bei 40000 * g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit NaOH (0,5 mol/l) bis auf pH 8 neutralisiert und weiterverwendet.

2.4.1.3. ACETON/METHANOL

Zur Probe wurde das 5-fache Volumen Aceton auf einem Magnetrührer zugegeben und anschließend der Ansatz 10 min bei 10000*g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Bodensatz mit einem 5-fachen Volumen Methanol aufgelöst und wiederum bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der erneut entstehende Bodensatz wurde mit einem 2-3-fachen Volumen Aceton aufgelöst. Nun wurde ein letztes Mal zentrifugiert und der Bodensatz getrocknet. Man erhielt auf diese Weise ein PLA-haltiges Pulver, das nach Auflösung mit destilliertem Wasser weiterverwendet werden konnte.

2.4.2. EINENGUNGSVERFAHREN

2.4.2.1 ULTRAFILTRATION

Zur Volumeneinengung wurde ein mit Pressluftüberdruck arbeitendes Amicon-8010-Ultrafiltrationsgerät oder die Superspeed-Zentrifuge RC-5B von Du Pont (5000 * g, 30 min) eingesetzt. Durch Überdruck bzw. Zentrifugalkraft werden die Lösungsflüssigkeit und kleinere Moleküle abgepreßt, während größere Moleküle ($MG > 10 \text{ kD}$) durch ein Filter zurückgehalten und konzentriert werden.

2.4.2.2. LYOPHILISIEREN

Serum, der Überstand nach Schwefelsäurefällung oder die Eluate von Säulenreinigungen wurden bei -80°C eingefroren und ca. 18 h im Lyophilisiergerät BETA I von Christ bei -30°C gefriergetrocknet. Das fast trockene Lyophilisat wurde mit kleinerem Volumen (Puffer oder destilliertes Wasser) aufgelöst.

2.4.2.3. DIALYSE GEGEN POLYÄTHYLENGLYCOL

PEG 6000 von Serva wurde in destilliertem Wasser in einer Konzentration nahe der Sättigungsgrenze (ca. 0.8 g/ml) gelöst. Die Dialyse des Materials gegen diese Lösung für 1-2 h führte zu starker Volumeneinengung.

2.4.3. CHROMATOGRAPHISCHE TRENNVERFAHREN

2.4.3.1. GELFILTRATION

Die Trennung beim Molekularsieb beruht auf der unterschiedlichen Fähigkeit der einzelnen Moleküle des aufgetragenen Materials, in Poren der stationären Phase einzudringen. Sehr große Moleküle, die niemals die stationäre Phase betreten, wandern durch das Gelbett am schnellsten, während kleinere Moleküle, die in die Poren des Gels eindringen, später eluiert werden. Die Moleküle erscheinen deshalb nach abnehmender Molekülgröße im Eluat (67).

Das Totalvolumen der Säule wurde mit V_t , das Ausschlußvolumen außerhalb des Gels als V_o bezeichnet. Das Gelvolumen errechnete sich, indem man V_o von V_t abzog. Mit V_e wurde das Elutionsvolumen eines bestimmten Proteins bezeichnet (68).

Es wurde mit zwei Säulen gearbeitet:

Kleine Säule (für analytische Zwecke)

Durchmesser : 0,9 cm
Fläche : 0,6 cm²
Gelhöhe : 60 cm
Totalvolumen (V_t): 38 cm³

Große Säule (für analytische und präparative Zwecke)

Durchmesser : 2,6 cm
Fläche : 5,3 cm²
Gelhöhe : 100 cm
Totalvolumen (V_t): 531 cm³

Die kleine Säule wurde mit Sephadex G-50 bzw. G-100, die große Säule mit Sephadex G-150 gefüllt.

Das Gelbett wurde mit dem gewünschten Puffer äquilibriert, dann wurde das Material aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Das Auftragsvolumen betrug 1-5% von V_i und die Flußrate etwa $2 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Eine Pumpe hielt eine gleichmäßige Fließgeschwindigkeit aufrecht, das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler aufgefangen.

Weiterhin diente eine Fertigsäule Sephadex G-25 M zur Abtrennung von Salzen. 2,3 ml Material (+ 0,002% Triton) wurden aufgetragen und mit TRIS-HCl-Puffer (20 mmol/l, pH 8,0 bzw. 8,4, 0,002% Triton) bei einer Flußrate von $18 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ eluiert. Die ersten 4 ml nach dem Totvolumen wurden gesammelt und für die weitere Präparation verwendet.

2.4.3.2. IONENAUSTAUSCHER

CM-Sepharose CL-6B besitzt negativ geladene Carboxymethylgruppen ($-\text{OCH}_2\text{COO}^-$) und eignet sich daher als Kationenaustauscher (69). Positiv geladene Moleküle des aufgetragenen Materials werden daran gebunden und können mit Salzen wie z.B. NaCl eluiert werden. Die Methode ist vom pH-Wert des Säulenpuffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins und der Ionenkonzentration abhängig.

Die verwendete Säule hatte einen Durchmesser von 1 cm und wurde mit unterschiedlichen Gelmengen gefüllt, die mit TRIS-HCl-Puffer (10 mmol/l, pH-Werte von 8,0-8,8) äquilibriert waren. Wechselnde Volumina des Materials wurden aufgetragen (s.Kap.3.1.2.). Anschließend wurde mit gleichem Puffer bis zur Proteinfreiheit des Eluates gespült. Die

Pumpe hielt eine Flußrate von $18 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ konstant, die Fraktionen wurden mit dem Fraktionssammler aufgefangen. CM-Sepharose wurde auch im Batch angewendet. Unterschiedliche Volumina von Material und Gel wurden in einem Becherglas gemischt, 10 min stehen gelassen und anschließend zentrifugiert (10 min $1500 \times g$). Eluiert wurde mit TRIS-HCl-Puffer (10mmol/l, pH 8,0, 1,0 mol/l NaCl).

2.4.3.3. HYDROPHOBE INTERAKTIONSCHROMATOGRAPHIE

Bei der HIC werden Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen hydrophoben Wechselwirkungen mit einem ungeladenen Gel getrennt (65,90). Als hydrophobe Gruppen im Gelmaterial dienen Octyl- oder Phenylreste. Die meisten Proteine können auf diese Weise getrennt werden, da sie Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten besitzen (6,49). Faktoren wie Ionenstärke und Osmolalität, Aussalzeffekte der Ionen, Detergenzien, Temperatur und pH-Wert beeinflussen die hydrophobe Bindung und können zur Elution eingesetzt werden.

Wir verwendeten Octyl-Sepharose CL-4B von Pharmacia, die in TRIS-HCl-Puffer (20 mmol/l, pH 8,4, 0,2 mol/l NaCl) äquilibriert wurde, für ein Batch-Verfahren. Zu Serum, eingestellt mit TRIS-HCl-Puffer (20 mmol/l, pH 8,4), wurde NaCl bis zu einer Konzentration von 0,2 mol/l gegeben. Auf 1 ml davon wurden 1,5 ml Gel gegeben. Die Lösung wurde mit dem Spatel gerührt, 10 min stehengelassen und anschließend 2 min bei $5000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand (Ü) wurde aufgehoben und das Gel mit 1 ml des oben beschriebenen Puffers gewaschen (W). Dabei wurde die Lösung wieder gut gerührt, 10 min stehengelassen und dann 2 min bei $5000 \times g$ zentrifugiert. Es

wurde viermal mit je 1 ml TRIS-HCl-Puffer (20 mmol/l, pH 8,4, 0,05% Triton) eluiert. Der Ansatz wurde jedesmal gemischt, stehengelassen und zentrifugiert wie bei den beiden vorhergehenden Schritten. Man erhielt so 4 Fraktionen.

2.5. REINHEITSPRÜFUNG MIT DER SDS-GELELEKTROPHORESE

Das Detergenz SDS (sodium dodecyl sulfate) besitzt die Fähigkeit, Proteine zu denaturieren (66). Die dabei entstehenden SDS-Protein-Komplexe weisen eine fast gleiche Ladungsdichte und Gestalt auf. Unterschiedliche Elektrophoretische Beweglichkeit beruht somit auf der unterschiedlichen Größe der Moleküle.

Wird weiterhin ein Polyacrylamid-Gradient verwendet, so wandern die Proteine in Abschnitte mit immer größerer Gelkonzentration und immer kleineren Poren.

Das Molekulargewicht der getrennten Proteine kann durch den Vergleich mit Eichproteinen bestimmt werden. Außerdem wird das Verfahren zur Reinheitsprüfung von Proteingemischen verwendet.

Für die Elektrophorese wurde das Phastsystem von Pharmacia (Phastgel Gradient 8-25) verwendet.

Das Material mit einer Proteinkonzentration von 200 mg/l wurde 1:2 bzw. 1:1,5 mit SDS-Puffer (pH 8,0, 20 mmol/l TRIS-HCl, 2mmol/l EDTA, 5% SDS, 10% β -Mercaptoethanol) verdünnt und 5 min bei 100 °C erhitzt. Je ein Fläschchen Molekulargewichtsmarker (LMW- bzw. HMW-Eichkit von Pharmacia) wurde in 1,5 ml destillierten Wassers aufgelöst. 1,5 ml SDS-Puffer wurde hinzugegeben und die Lösung bei 100 °C erhitzt. 1 μ l Probe wurde aufgetragen und die Trennung bei

folgenden Bedingungen durchgeführt:

250 V 10,0 mA 3,0 W 15 °C 40 min

Eine anschließende Silberfärbung mit 0,25% Silbernitrat machte die Proteinbanden sichtbar.

2.6. DICHTEBESTIMMUNG MIT EINEM KONTINUIERLICHEN KALIUMBROMID-GRADIENTEN

Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurde in einem Zentrifugenglas ein kontinuierlicher KBr-Dichtegradient hergestellt. Eine Schlauchpumpe gewährleistete die gleichmäßige Zufuhr steigender KBr-Konzentrationen (0-300 g/l). Der Gradient wies am Boden des Gefäßes die größte Dichte auf, die kontinuierlich nach oben abnahm (1,15 bis 1,03 g/ml). Das vorsichtig auf den Gradienten aufgetragene Material wurde nun ca. 24 h mit der Ultrazentrifuge bei 100.000 x g zentrifugiert und anschließend mit der Schlauchpumpe in mehreren Fraktionen zu je 0,5 ml mit abnehmender Dichte gesammelt. In den Fraktionen wurden die Dichte, die PLA-Aktivität und die Extinktion bei E_{280} bestimmt.

2.7. QUALITÄTSKONTROLLE UND STATISTIK

Zur Ermittlung der Präzision wurden Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (Vk) errechnet. Weiterhin kam die lineare Korrelationsanalyse zur Anwendung.

3. ERGEBNISSE

3.1. ENZYMANREICHERUNG

3.1.1. FÄLLUNGSVERFAHREN

Durch eine 70% Ammoniumsulfatfällung im Serum gelang es mit einem Verlust von 50% und einer 2,4-fachen Volumenreduktion, die PLA-Volumenaktivität um den Faktor 1,2 zu erhöhen. Bei pH 6,5 ergab sich ein ähnliches Ergebnis wie bei pH 8,0. Versuche, Serum mit Ammoniumsulfat stärker zu konzentrieren, erbrachten Aktivitätsverluste von mehr als 80%. Bei einer Fällung mit niedrigeren Ammoniumsulfat-Konzentrationen blieben weniger als 70% der Aktivität im Überstand, ohne daß damit ein nennenswerter Reinigungseffekt verbunden war. Eine Durchführung der Versuche bei 4 °C erbrachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Ammoniumsulfat-Fällung im Überstand nach Schwefelsäurefällung und in PLA-haltigen Fraktionen nach Chromatographie auf Sephadex G-150 (s.u.). Die Ammoniumsulfat-Fällung wurde somit für die Enzymanreicherung und -konzentrierung nicht weiter eingesetzt.

Als weiteres Verfahren wurde die in Kapitel 2.4.1.2. beschriebene Schwefelsäurefällung angewendet. Ziel dieser Methode war, einen Großteil der Proteine auszufällen und die Aktivität der hitze- und säurestabilen PLA im Überstand zu erhalten. Aus der Tabelle 3 geht hervor, daß die Proteinkonzentration um den Faktor 17 abnahm. Die spezifi-

sche Aktivität nahm dabei um den Faktor 15 zu, da die Gesamtaktivität der PLA durch die Säure- und Hitzebehandlung nur gering beeinträchtigt wurde. Deshalb wurde diese kombinierte Säure-Hitze-Fällung als erster von drei Anreicherungsschritten (s.Kap.3.1.4.) verwendet.

Material	PLA mU	Menge ml	Protein mg	Spez. Akt. U/g
Serum	836	11,0	515	1,6
Überstand (H ₂ SO ₄ + Hitze)	710	7,4	30	23,7

Tab.3: Schwefelsäure-Hitze-Fällung als Vorreinigungsschritt.
Die Proteinkonzentration wurde mit der Biuretmethode bestimmt

In einigen Versuchen wurde der Überstand nach Schwefelsäure-Hitze-Fällung mit einer Aceton/Methanol-Fällung (s. Kap.2.4.1.3.) weiterbehandelt (s.Tab.4) und das so erhaltene Pulver in einer kleinen Menge Wasser wieder aufgenommen. Durch die Kombination dieser Methoden nahm die PLA-Volumen-Aktivität um den Faktor 4,1, die spezifische Aktivität um den Faktor 6,4 zu, während das Volumen 7,6-fach abnahm. Die Ausbeute nach diesen zwei Schritten betrug 54 %. Der Aceton/Methanolschritt eignet sich somit weniger zur Reinigung des Enzyms als vielmehr zur Volumeneinengung und zur Aufbewahrung größerer PLA-Mengen in Pulverform.

Material	Konz. U/l	PLA mU	Menge ml	Prot. mg	Sp.Akt. U/g
Serum	54	378	7	351	1,1
Überstand (H ₂ SO ₄ + Hitze)	63	302	4,8	36	8,4
Aceton/ Methanol Pulver + H ₂ O	222	204	0,92	29	7,0

Tab.4: H₂SO₄/Hitze kombiniert mit Aceton/Methanol.

3.1.2. CHROMATOGRAPHISCHE TRENNVERSUCHE

Unter der Annahme eines niedrigen Molekulargewichts von etwa 15 kD (53) wurde zunächst Sephadex G-50 als Molekularsieb verwendet. Bei der Gelfiltration wurden Seren aus den verschiedenen Pools (2.1.) aufgetragen, um Unterschiede bei der Auftrennung zu untersuchen. Auf Sephadex G-50 wurde Material aus dem "sauren" Pool gegeben. Das Ergebnis nach Auftragung von Serum aus dem "alkalischen" Pool ist weiter unten bei der Verwendung von Sephadex G-150 beschrieben. Serum aus dem "sauren" Pool wurde durch Ultrafiltration (Superspeed-Zentrifuge RC-5B) konzentriert. Vom Konzentrat mit einer PLA-Aktivität von 170 U/l bei pH 6,5 bzw. 100 U/l bei pH 8,0 wurden 0,6 ml auf die Säule aufgetragen und eine Flußgeschwindigkeit von 2,3 ml cm⁻² h⁻¹ eingestellt. In

den aufgefangenen Fraktionen mit einem Volumen von je 1 ml wurde die PLA-Aktivität bei pH 6,5 und 8,0 sowie die Proteinkonzentration mit der Bradfordmethode bestimmt.

In Abbildung 9 erkennt man zwei Gipfel mit etwa gleicher Aktivität, wobei der erste Gipfel ($MG > 30.000$) keine pH-Präferenz zeigte, der zweite ($MG \text{ ca. } 15.000$) nur bei pH 6,5 meßbar war.

Fast alles Protein erschien in den Fraktionen knapp vor, ein kleiner Proteinpeak direkt beim ersten PLA-Peak.

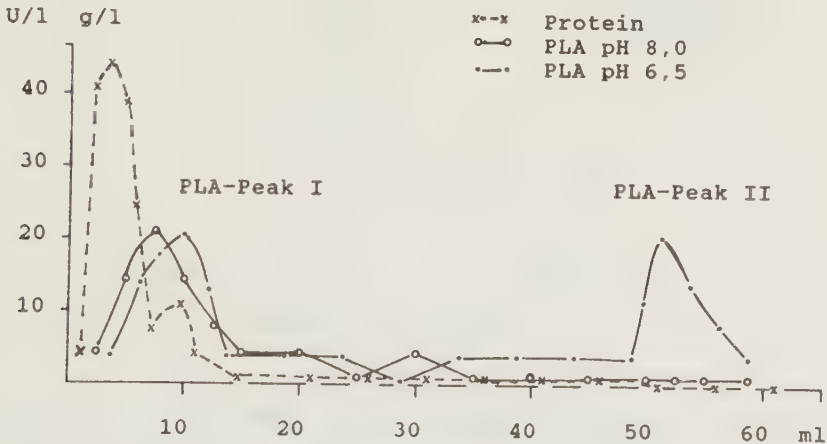


Abb.9: Auftrennung von Serum aus dem "sauren" Pool mit Sephadex G-50.

Wegen des hohen Molekulargewichts von Peak I wurde anschließend mit Sephadex G-100 und danach mit Sephadex G-150 weitergearbeitet.

Die Eichung, durchgeführt nach Anleitung der Hersteller (68), ergab folgende Elutionskurven (s. Abb.10).

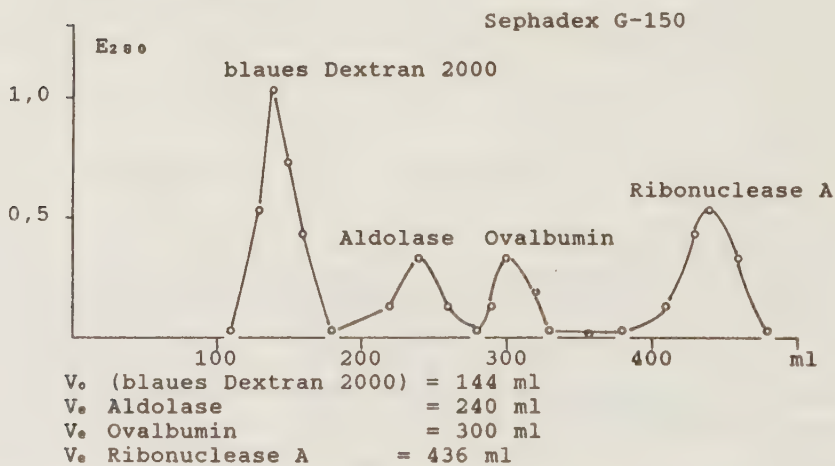
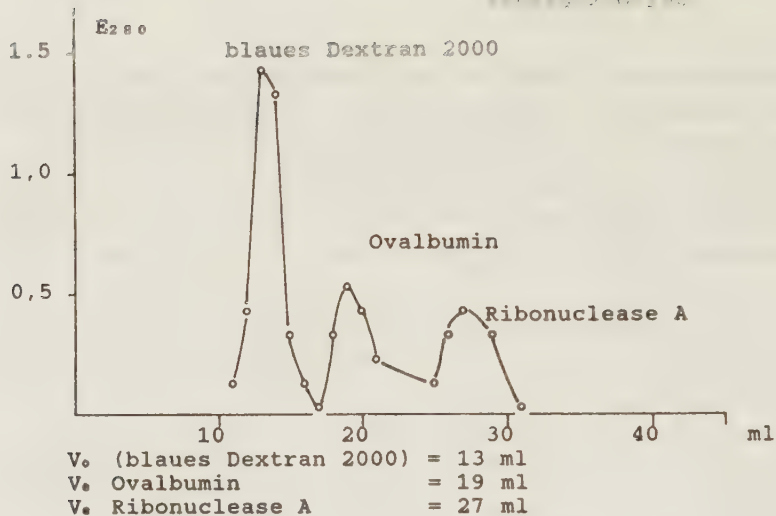


Abb.10: Eichkurven für Sephadex G-100 und G-150.

V_o : Ausschlußvolumen

V_e : Elutionsvolumen eines bestimmten Proteins
Molekulargewicht der Eichproteine:

Dextran Blau 2000: 2.000.000

Aldolase : 158.000

Ovalbumin : 43.000

Ribonuclease A : 13.700

Unter gleichen Bedingungen wurde konzentriertes Serum (Amicon Ultrafiltrationsgerät) mit 125 U/l (pH 6,5) und 152 U/l (pH 8,0) auf Sephadex G-100 aufgetragen und anschließend in den Fraktionen die Aktivität bei beiden pH-Werten, Albumin (Methode mit Bromcresolgrün) IgG sowie die Extinktion bei E_{280} bestimmt (s.Abb.11).

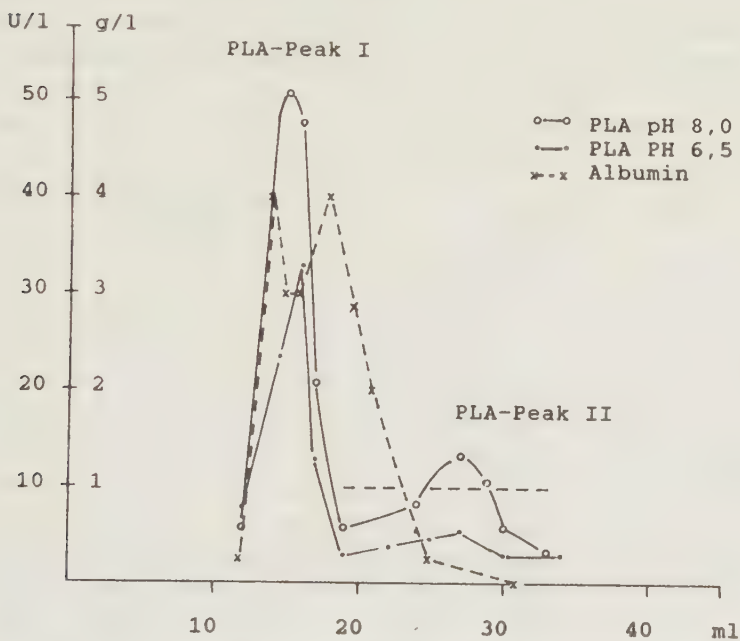


Abb.11: Auftrennung von konzentriertem Serum mit Sephadex G-100 (-- = Nachweisgrenze der PLA).

An der Stelle des ersten PLA-Peaks, unmittelbar nach Dextran (s.Eichkurve), erschien der erste Albumin- und der IgGpeak (wurde nicht eingezeichnet). Albumin war breiter verteilt und wies einen zweiten Gipfel kurz vor dem Ovalbumin (MG 43000) auf.

Für die weitere Anreicherung und Charakterisierung wurde nur noch Sephadex G-150 verwendet.

Ein typisches Versuchsergebnis zeigt Abbildung 12. Auf die Säule wurden 5 ml aufgetautes Serum aus dem "alkalischen" Pool mit einer Aktivität nach dem Auftauen von 74 U/l bei pH 6,5 und 110 U/l bei pH 8,0 aufgetragen. Die Flußrate betrug $2,2 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, das Fraktionsvolumen 5,3 ml. In den Fraktionen wurde die Aktivität bei beiden pH-Werten, E_{280} (nicht eingezeichnet) und die IgG-Konzentration bestimmt.

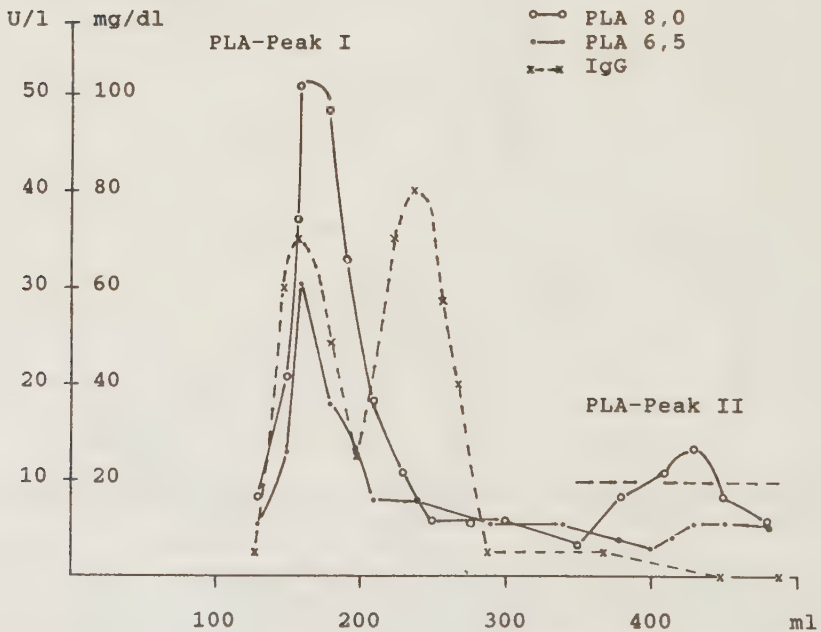


Abb.12: Auftrennung von Serum aus dem "alkalischen" Pool mit Sephadex G-150 (-- = Nachweisgrenze der PLA).

Wiederum waren zwei Gipfel mit PLA-Aktivität zu sehen. Der erste Aktivitätsgipfel mit einer Aktivität von 50 U/l bei pH 8,0 befand sich unmittelbar nach dem Dextranpeak, der erheblich kleinere Peak II (bei pH 8,0: 13 U/l) kurz vor dem Ribonuclease-A-Peak. Peak II zeigte bei pH 6,5 keine Aktivität.

Die IgG-Konzentration zeigte zwei Gipfel, wobei der erste Gipfel mit Aktivitätspeak I zusammenfiel. Der zweite IgG-Peak erschien im Bereich der Aldolase (s. Eichkurve). Die Fraktionen von Peak I nach Sephadex G-150 wurden gepoolt, eingefroren und für die beschriebene Anreicherung (s. Kap. 3.1.4.) sowie zur weiteren Charakterisierung (vgl. Abschn. 3.2.) verwendet.

Gereinigte PLA₂ aus Duodenalsaft bindet sehr gut auf dem Kationenaustauscher CM-Sephrose CL-6B (53). Deshalb wurde geprüft, inwieweit dieses Gel auch für die Anreicherung von PLA aus dem Serum geeignet war.

Auf 7 ml Gel, äquilibriert mit TRIS-HCl-Puffer (10 mmol/l, pH 8,0), wurden 5,4 ml gegen gleichen Puffer dialysiertes Serum mit einer Ausgangsaktivität von 38 U/l (pH 8,0) bzw. 30 U/l (pH 6,5) aufgetragen. Das entspricht 0,8 ml Serum, 40 mg Protein bzw. 29 mU pro ml Gel. In den Fraktionen wurde die Aktivität bei beiden pH-Werten und E₂₈₀ gemessen (s. Abb. 13).

Auf CM-Sephrose CL-6B wurde ein Teil (45%) der aufgetragenen PLA-Aktivität gebunden (Peak II), der erst bei hohen NaCl-Konzentrationen eluierbar war (0,6-0,7 mol/l). 24% der Aktivität wurden nicht gebunden (Peak I). Der gesamte Aktivitätsverlust betrug 31%. Für E₂₈₀ ergaben sich zwei Peaks. Proteinpeak I wurde nicht gebunden, während Proteinpeak II etwa bei 0,3 mol/l NaCl also vor der PLA eluiert wurde.

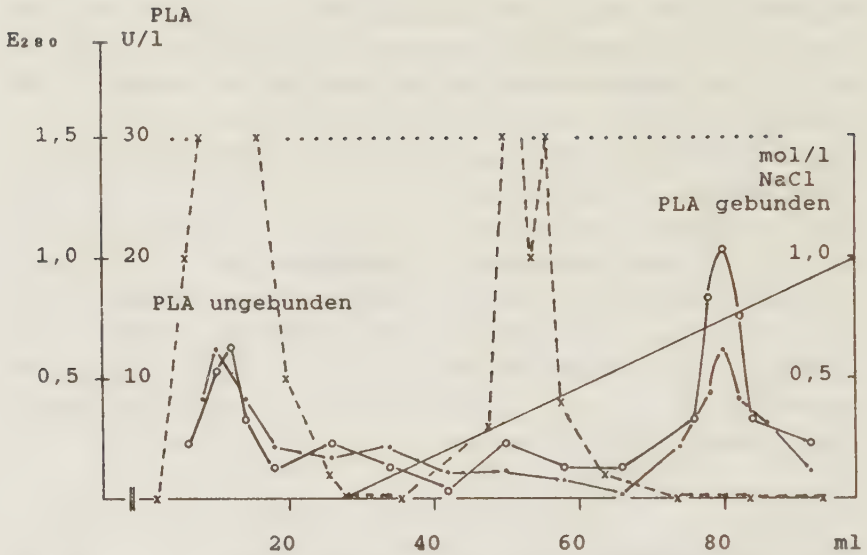


Abb.13: Ionenaustauscherchromatographie von Serumphospholipase auf CM-Sepharose CL-6B bei pH 8,0.

- PLA pH 8,0
- PLA pH 6,5
- x-x E_{280}
- ... obere Grenze E_{280}
- NaCl

Aus dem beschriebenen Bindungsverhalten der PLA konnte nicht unbedingt auf das Vorhandensein von 2 verschiedenen Enzymfraktionen geschlossen werden. Ähnliche Profile ergeben sich auch bei Überlastung des Gels. Deshalb wurde unter gleichen Bedingungen weniger dialysiertes Serum (3,5 ml) auf die doppelte Gelmenge aufgetragen (0,27 ml Serum, 14 mg Protein bzw. 12 mU pro ml Gel). Die Aktivität im Serum betrug bei pH 8,0 45 U/l, bei pH 6,5 27 U/l. Es ergab sich das gleiche Bild. Die Auftragsmenge entsprach 182 mg Serumprotein, davon wurden 42% nicht gebunden, in Protein-

peak II befanden sich 9% des aufgetragenen Gesamtproteins. Die Proteinkonzentration im ersten Aktivitätspeak betrug 10,7 g/l, im zweiten Aktivitätspeak 57 mg/l (Bradfordmethode).

Um das Bindungsvermögen von CM-Sepharose zu testen, wurde daraufhin ein Batch-Versuch durchgeführt, bei dem je 1 ml dialysiertes Serum (Ausgangsaktivität: 42 U/l) zu steigenden Mengen Gel (0,2 0,4 0,6 0,8 1,0 ml) gegeben wurde. Eluiert wurde mit TRIS-HCl-Puffer (10 mmol/l, pH 8,0) mit 1,0 mol/l NaCl.

Bei allen Gelvolumina wurden im Überstand ca. 30 U/l, im Eluat ca. 12 U/l gemessen. Das bedeutet, daß schon 0,2 ml Gel ausreichten, um die gesamte bindungsfähige PLA aufzunehmen. Dies entspräche einem Verhältnis von 5 ml Serum bzw. 210 mU pro ml Gel.

Zwei weitere Beobachtungen sprachen gegen Überlastung des Gels. Der zweite Enzympeak der Säulenläufe wurde erst durch hohe NaCl-Konzentrationen eluiert, was auf eine besonders feste Bindung schließen ließ. Außerdem schien das pH-Profil der beiden Enzympeaks unterschiedlich zu sein, denn der ungebundene Anteil der PLA war bei pH 6,5 und 8,0 gleich aktiv, der gebundene nur bei pH 8,0 gut meßbar. Dies bestätigte auch der folgende Versuch.

Der Säulenlauf wurde wiederholt (0,24 ml Serum, 11 mg Protein, bzw. 9 mU pro ml Gel) mit pH 8,4, um den zweiten Proteinpeak zu verkleinern und insgesamt weniger Protein zu binden. Durch eine Erhöhung des pH-Wertes bekommen immer mehr Proteine eine negative Gesamtladung (47). Bei pH 8,4 sind nur noch Proteine mit einem höheren isoelektrischen Punkt positiv geladen und damit auf dem Kationenaustauscher bindungsfähig. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß für die PLA mehrfach ein hoher isoelektri-

scher Punkt beschrieben wurde (98,100).

Die Abbildung 14 zeigt, daß das Bindungsverhalten der PLA bei pH 8,4 mit dem bei pH 8,0 vergleichbar war, wie erwartet aber die Extinktion bei E_{280} des zweiten Proteinpeaks abnahm. 133 mg Protein wurden aufgetragen, wovon diesmal 71% nicht gebunden wurden. In Proteinpeak II befanden sich noch etwa 7% des aufgetragenen Gesamtproteins (Methode nach Bradford).

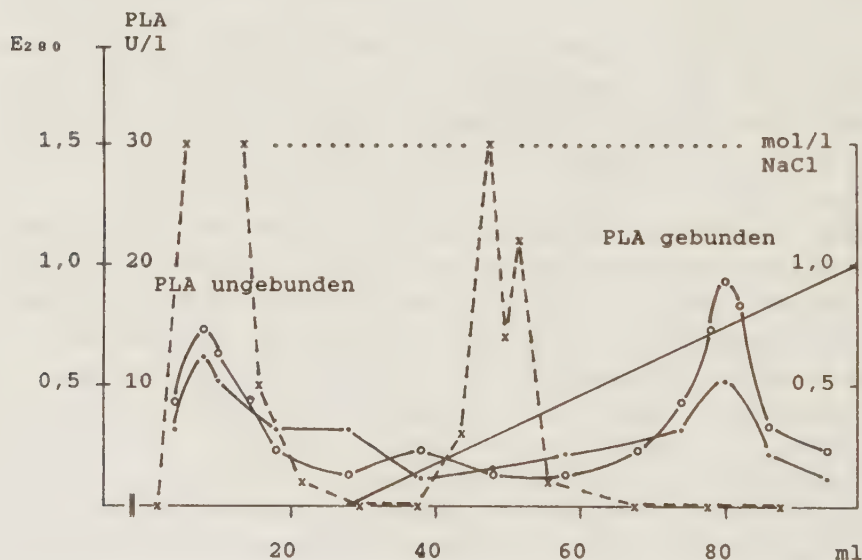


Abb.14: Ionenaustauscherchromatographie von Serumphospholipase auf CM-Sepharose CL-6B bei pH 8,4.

○-○ PLA pH 8,0

●-● PLA pH 6,5

x-x E_{280}

... obere Grenze E_{280}

— NaCl

Auch das Bindungsverhalten einer mit Schwefelsäurefällung

und Sephadex G-150 vorgereinigten Enzymfraktion wurde geprüft (s.Kap.3.1.4.). Bei einem pH-Wert von 8,0 wurden 12,3 ml des gepoolten PLA-Peaks I auf 5 ml Gel aufgetragen (2 mg Protein bzw. 130 mU pro ml Gel).

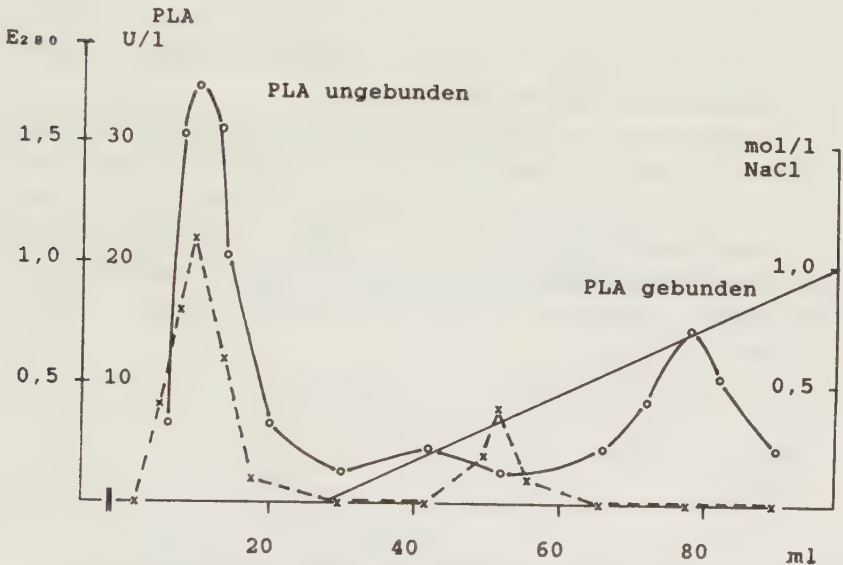


Abb.15: Ionenaustauscherchromatographie von vorgereinigtem Material nach Schwefelsäure-Hitze-Fällung und Sephadex G-150 auf CM-Sepharose CL-6B bei pH 8,0.

o—o PLA 8,0

x—x E_{280}

— NaCl

Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach der Auftragung von unbehandeltem Serum (vgl. Abb.13 u. Abb.15). Aufgrund der Vorreinigung war die Proteinkonzentration erwartungsgemäß erheblich niedriger. Allerdings wurde in Enzympeak II nur noch 14% der aufgetragenen Gesamtaktivität und damit um 31%

weniger als nach dem Auftragen von Serum gebunden. 49% der aufgetragenen Aktivität wurden nicht gebunden. Der Verlust betrug 37%. Aufgrund dieses Verhaltens war zu vermuten, daß die Vorreinigung zu einer Verringerung der bindungsfähigen PLA führte.

Als weiteres Trennverfahren wurde die hydrophobe Interaktionschromatographie angewendet.

Bei batchweisen Mischungen erwies sich in Vorversuchen ein Verhältnis von 1 ml Serum auf 1 bis 1,5 ml Gel (Octyl-Sepharose CL-4B) als optimal. Dabei wurden auf je 1 ml Serum steigende Mengen Gel (0,2, 0,4, 0,6 ml) gegeben und die PLA-Aktivität im Überstand und in den Eluatens gemessen. Mit steigendem Gelvolumen nahm die Aktivität im Überstand ab (s. Abb.16).

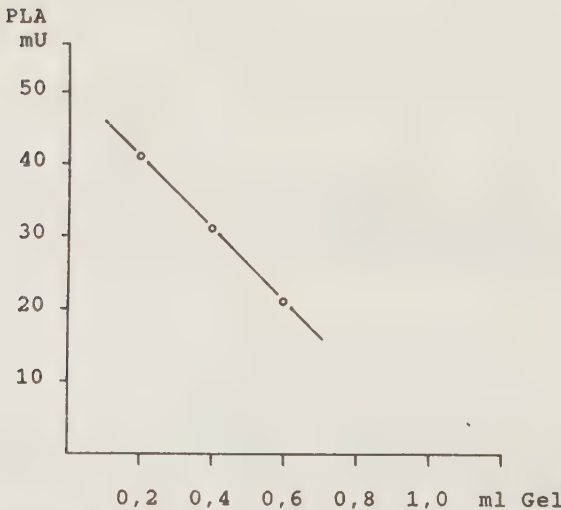


Abb.16: Bindungsverhalten von Octyl-Sepharose CL-4B im Vorversuch: Abnahme der Aktivität im Überstand bei steigendem Gelvolumen.

Der Batchversuch wurde nun mit dem oben ermittelten Verhältnis von 1 ml Serum auf 1,5 ml Gel durchgeführt. Die PLA-Aktivitätsmessung zeigte, daß sich das Enzym ca. im Verhältnis 1:1 zwischen Gel und Überstand verteilte (s. Abb.17).

% der Anfangskonzentration

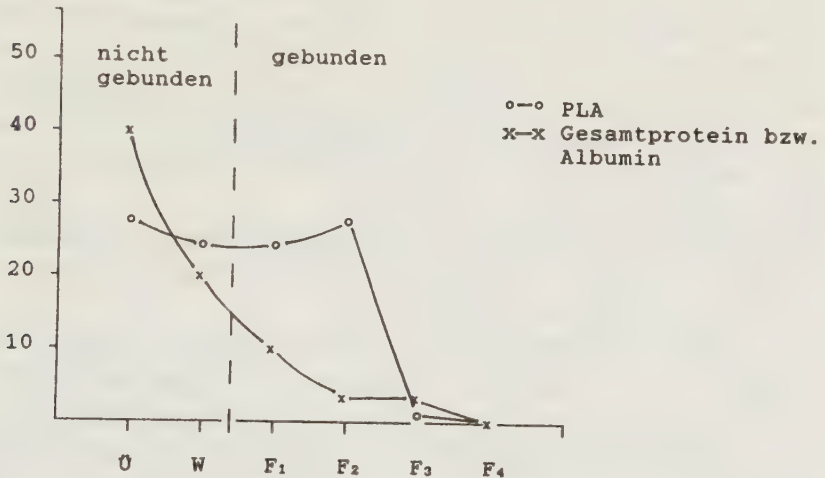


Abb.17: Bindung von PLA, Albumin und Protein bei der HIC.
Ü = Überstand, W = Waschfraktion, F₁₋₄ = Eluate.

Wie aus der gleichen Abbildung ersichtlich, wurden Protein und Albumin zu etwa 60% nicht gebunden, 17% konnten mit Puffer + Triton eluiert werden, 23% blieben weiter gebunden. In den gepoolten Fraktionen F₁ und F₂ wurde die PLA etwa um den Faktor 3 angereichert.

3.1.3. EINENGUNGSVERFAHREN

Wegen der relativ geringen Ausgangsaktivität der PLA im Serum und der bei Säulenreinigungen auftretenden Verdünnungseffekte wurde nach einem geeigneten Einengungsverfahren gesucht, das bei möglichst guter Ausbeute eine Vervielfachung der ursprünglichen Volumenaktivität erbringen sollte.

Die Ultrafiltration steigerte die Volumenaktivität im Serum um den Faktor 1,7 bei einer 3,8-fachen Volumenabnahme. Die Ausbeute betrug somit nur 45%.

Die Konzentrierung von Peak I (Sephadex G-150) erbrachte etwas bessere Ergebnisse. Bei einer 58%igen Ausbeute wurde die Aktivität 1,8-fach konzentriert und das Volumen um den Faktor 3,1 kleiner.

Bei der Dialyse gegen Polyäthylenglycol nahm das Volumen im Serum 3,3-fach ab, die PLA-Konzentration um den Faktor 1,3 zu, die Ausbeute betrug 39%.

Die gleiche Methode reduzierte das Volumen von Peak I nach Sephadex um den Faktor 5, steigerte die Volumenaktivität um den Faktor 2,3 und führte zu einem Verlust von 54%.

Als weiteres Einengungsverfahren wurde die Lyophilisation getestet.

Vor dem Einfrieren wurde versuchsweise Mannit (5-10 mg/l), Glycerin (10-20%), Dithioerythrit (2 mmol/l) oder 2-Mercaptoäthanol (0,15 mmol/l) zugegeben, um etwaige Aktivitätsverluste zu verringern.

Die Ergebnisse für Serum und Peak I nach Sephadex G-150 sind in Tabelle 5 zusammengefaßt:

Nach Zusatz von 2-Mercaptoäthanol (0,15 mmol/l) war keine Aktivität mehr meßbar, was auf eine Reduktion essentieller Disulfidbrücken schließen läßt. Dithioerythrit (2 mmol/l)

Material	Konzentrierung Faktor	Ausbeute %
Serum ohne Zusatz	*1,5	50
Serum + Glycerin 20%	*1,1	37
Serum + Mannit 10 mg/ml	*1,7	57
Peak I ohne Zusatz	*2,3	77
Peak I + Glycerin 20%	*1,1	37
Peak I + Man- nit 10 mg/ml	*1,4	47

Tab.5: Lyophilisation von Serum und Peak I (Sephadex G-150) bei Aufnahme in 1/3 des Ausgangsvolumens.

führte ebenfalls zur Zerstörung der Aktivität (nicht dargestellt). Versuche, das Lyophilisat mit kleinerem Volumen aufzulösen, erbrachten sehr hohe Verluste (70-80 %) bei unwesentlicher Volumenaktivitätszunahme. Durch eine vor der Lyophilisation mit der Fertigsäule Sephadex G-25 M durchgeführte Abtrennung von Salzen, von denen eine inhibitorische Wirkung bei stärkerer Konzentrierung vermutet wurde, konn-

ten die Resultate nicht verbessert werden.

Vergleichbare Ergebnisse ergab das Lyophilisieren des Überstandes nach Schwefelsäurefällung. Wegen zu geringer Aktivität konnte Peak II nach Sephadex G-150 bzw. CM-Sephrose nicht lyophilisiert werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich keine der erprobten Methoden für eine stärkere Konzentrierung der Serum-PLA eignete, da bei stärkerer Volumeneinengung die Aktivität erheblich abnahm.

3.1.4. KOMBINATION DER VERSCHIEDENEN SCHRITTE

Die Serum-PLA wurde durch eine Kombination von Schwefelsäurefällung + Hitze, Sephadex G-150 und CM-Sephrose CL-6B angereichert. Die einzelnen Schritte sind in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben. Ein typisches Beispiel einer solchen Anreicherung beschreibt die Tabelle 6. Die Proteinkonzentrationen wurden mit der Biuretmethode gemessen. Die Proteinkonzentration von Peak II nach CM-Sephrose konnte mit dieser Methode nicht mehr bestimmt werden, deshalb wurde die Bradfordmethode angewendet.

Mit diesem Verfahren wurde die PLA in den Fraktionen des ersten Aktivitätspeaks nach CM-Sephrose 100-fach (Ausbeute 38 %), im zweiten Aktivitätsgipfel 563-fach (Ausbeute 11 %) angereichert.

Material	PLA U/l pH 8,0	U	Protein mg	Menge ml	Spez.Akt. U/mg	Anreich.	Ausb. %
Serum	76	0,836	515	11	0,0016	1	100
H ₂ SO ₄ + Hitze	96	0,710	30	7,4	0,024	15	85
G-150 Peak I	53	0,652	11	12,3	0,090	56	78
CM-Seph. Peak I	32	0,320	2	10	0,160	100	38
Peak II	15	0,090	0,1	6	0,900	563	11

Tab.6: Anreicherung der PLA aus dem Serum mit Schwefelsäure-Hitze-Fällung, Sephadex G-150 (Molekularsieb) und CM-Sepharose CL-6B (Kationenaustauscher).

Die anschließende SDS-Gelelektrophorese (Peak I nach CM-Sephrose CL-6B) ergab folgendes Bild (s.Abb.18).



Abb.18: SDS-Gelelektrophorese nach Schwefelsäure-Hitze-Fällung, Sephadex G-150 und CM-Sephrose CL-6B (PeakI)

Die Abbildung zeigt, daß trotz Anreicherung weiterhin ein Proteingemisch vorliegt. Wie nach Sephadex G-150 zu erwarten ist, findet man Banden u. a. im höhermolekularen Bereich. Die stärkste Bande sieht man aber im Albuminbereich. Auffällig ist ferner eine deutliche Bande etwa bei 15 kD, die aufgrund der Vorreinigung mit Sephadex G-150 nicht zu erwarten war.

3.2. CHARAKTERISIERUNG DER ANGEREICHERTEN PLA

Für die folgende Charakterisierung wurden die gepoolten Fraktionen von Peak I nach Sephadex G-150 (s. Tab.6), für die Dichtebestimmung Nativserum verwendet.

3.2.1. MOLEKULARGEWICHT

Aus der für Sephadex G-150 erhaltenen Eichkurve (s.Abb.10) war ersichtlich, daß der Enzympeak I (s.Abb.12) unmittelbar nach dem Dextran und weit vor der Aldolase (MG 158.000) erschien. Für die Moleküle von Peak I kann deshalb ein Molekulargewicht von größer 160 kD angenommen werden.

3.2.2. PH-OPTIMUM

Im Serum eines 70jährigen Patienten, der sich wegen eines penetrierenden Ulcus duodeni einer Operation unterziehen mußte, wurde die PLA-Aktivität im Serum bei drei verschiedenen pH-Werten (pH 6,5 7,4 8,0) bestimmt. In Tab.7 sieht man einen Abfall der "sauren" und einen Anstieg der "alkalischen" PLA mit einem höchsten Wert am Todestag. Es scheint im Serum also mindestens zwei verschiedene PLA-Formen mit unterschiedlichen pH-Optima zu geben. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde in den gepoolten Fraktionen des ersten Peaks nach Sephadex G-150 das pH-Optimum bestimmt.

Tag nach Aufnahme	PLA-Aktivität (U/l)		
	pH 6,5	pH 7,4	pH 8,0
1	27	13	12
2	36	13	13
5	22	14	14
6	15	22	24
7 +	13	30	45

Tab.7: Messung der PLA-Aktivität im Serum bei drei verschiedenen pH-Werten bei einem 70jährigen Patienten mit penetrierendem Ulcus duodeni.

Verwendet wurden drei Puffer:

Acetat-Puffer (0,1 mol/l Essigsäure + NaOH ad pH) für pH:

4,0 4,5 5,0 5,5 6,0

TRIS-Maleat-Puffer (0,1 mol/l) für pH:

5,5 6,6 6,5 7,0 7,5

TRIS-HCl-Puffer (0,1 mol/l) für pH:

7,0 7,5 8,0 8,5 9,0

Das PLA-Substrat von Boehringer Mannheim wurde in gleichen Teilen in diesen 15 Puffern gelöst und damit die Aktivität bestimmt. Das Ergebnis zeigt die Kurve in Abb.19:

Es ergibt sich für die Peak-I-PLA ein pH-Optimum bei pH 7,0. Dies ist überraschend, denn im Ausgangsmaterial (pH 6,5: 113 U/l, pH 8,0: 183 U/l) und bei der Aktivitätsbestimmung in den Fraktionen nach Molekularsieb (höchster Wert von Peak I: pH 6,5: 28 U/l, pH 8,0: 51 U/l) war die Aktivität bei pH 8,0 höher als bei pH 6,5. Allerdings wurde bereits nach dem Poolen der Fraktionen des Peaks I vor dem

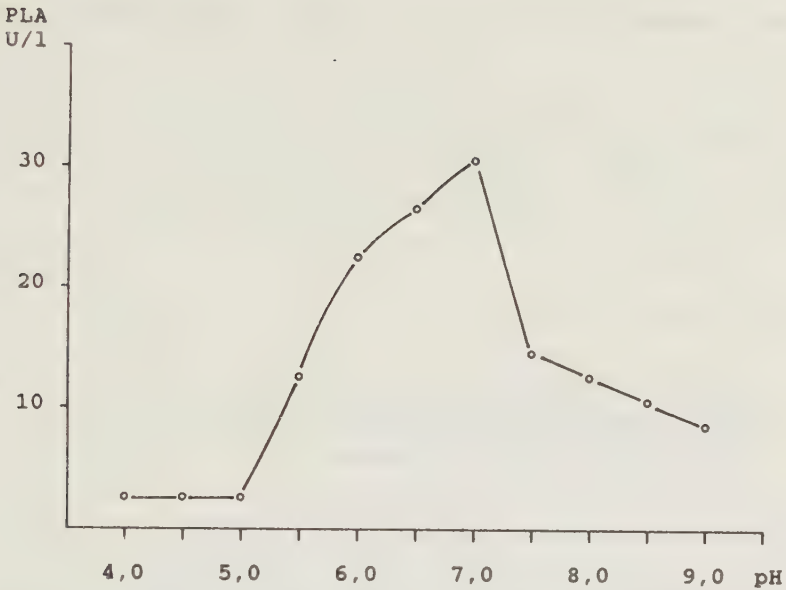


Abb.19: Ph-Optimum der Peak-I-PLA nach Sephadex G-150.

Einfrieren eine höhere Aktivität bei pH 6,5 (pH 6,5: 33 U/l, pH 8,0: 25 U/l) gemessen.

Bei Verwendung der oben angegebenen Puffer wurde für gereinigte PLA₂ aus Duodenalsaft (53) ebenfalls ein pH-Optimum von etwa pH 7 bestimmt.

3.2.3. MESSUNG DER PLA₂-AKTIVITÄT

In Peak I und in Seren mit unterschiedlichen Konzentrationen wurde vergleichend die Aktivität mit dem Isotopentest (s. Kap.2.3.2.3.) und der Handmethode (s. Kap.2.3.2.1.) be-

stimmt (Doppelbestimmung). Die Meßwerte zeigt Tabelle 8.

Probe	Handmethode PLA U/l	Isotopentest PLA ₂ U/l
Peak I	57	45
Serum1	40	37
Serum2	52	79
Serum3	324	294

Tab.8: Messung der Aktivität in Peak I und im Serum mit dem Isotopentest und der manuellen photometrischen Methode.

Wegen der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen kann aus diesem Ergebnis zwar die Anwesenheit von PLA₁ in Peak I und im Serum nicht sicher ausgeschlossen werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß sowohl im Peak I als auch im Serum größtenteils PLA₂-Aktivität vorkommt.

3.2.4. INHIBITOREN

Ein Antikörperkonzentrat (s.Kap.2.2.1.) mit einer Konzentration von 12 mg/l und einem Anteil von 12% spezifischem Anti-PLA₂-IgG wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Zu je 100 µl aus dem gepoolten Peak I (Sephadex G-150) mit einer Ausgangsaktivität von 52 U/l wurden 10, 20 bzw. 50 µl verdünntes Antikörperkonzentrat gegeben. Nach 30 min und 60 min Inkubationszeit (Zimmertemperatur) wurde die PLA-Akti-

vität bei pH 8,0 gemessen. Der Versuch ergab nach 30 min und auch nach 60 min keine Hemmung.

Mit einem angenommenen Wert von 1000 U/mg Protein (53) wären beispielsweise bei Zugabe von 10 µl Antikörperserum die Antikörper in 30-fachem Überschuß vorhanden. Dabei wird für IgG ein Molekulargewicht von 150 kD und für das Molekül mit PLA-Aktivität ein Molekulargewicht von 15 kD angenommen.

Der Versuch wurde auch mit unbehandeltem Serum durchgeführt und führte ebenfalls nicht zur Hemmung.

Ein Hemmversuch von Peak II nach Molekularsieb (s. 3.1.2.) gelang nicht, denn die ohnehin geringe Aktivität war nach dem Auftauen nicht mehr meßbar.

Als Positivkontrolle wurde das gleiche Experiment mit durch Delipidierung und hydrophobe Chromatographie angereicherter PLA₂ aus dem Duodenalsaft (53) durchgeführt.

Aus Abb. 20 wird eine deutliche Hemmung dieser PLA₂ mit dem gleichen Antiserum nach 30 min bzw. 60 min sichtbar.

Da die Phospholipase-Aktivität von Ca⁺⁺ abhängig ist, wurde der Einfluß von CaCl₂ und EDTA auf die Peak-I-PLA untersucht.

Substrat von Boehringer Mannheim wurde in fünf gleiche Portionen abgewogen und in je 1 ml TRIS-HCl-Puffer (10 mmol/l, pH 8,0) aufgelöst. Zu jeder dieser fünf Lösungen wurden 2 mmol/l EDTA und steigende Mengen CaCl₂ (0, 1, 2, 4 und 5 mmol/l) gegeben. In diesen fünf Ansätzen wurde jeweils die PLA-Aktivität von Peak I bestimmt (Abb.21).

EDTA hemmte die Aktivität völlig, Zugabe von CaCl₂ reaktivierte die PLA. Die höchste Aktivität wurde bei 4 mmol/l CaCl₂ gemessen, bei 5 mmol/l war eine leichte Abnahme der Aktivität zu beobachten.

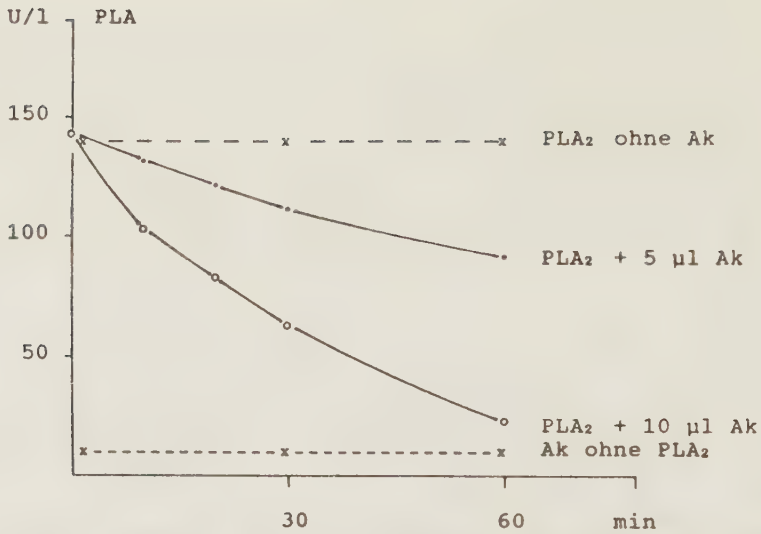


Abb.20: Hemmung von angereicherter PLA₂ aus dem Duodenalsaft mit Antikörper gegen humane Pankreas-PLA₂ (Ak).

Relative Aktivität

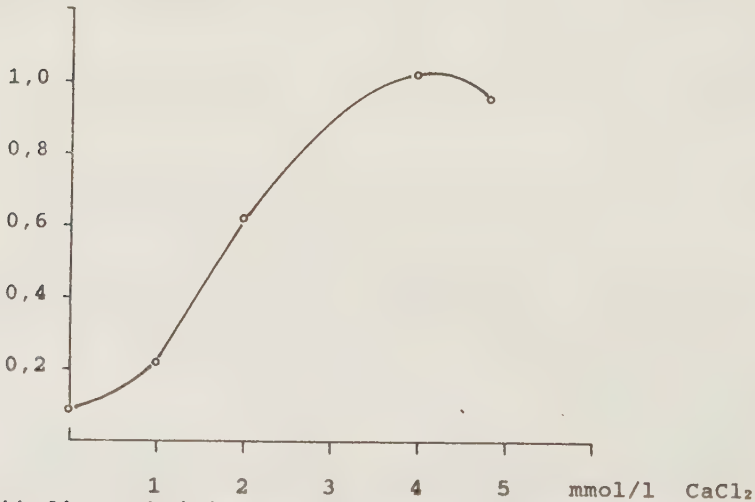


Abb.21: Reaktivierung der Peak-I-PLA durch CaCl₂ in Anwesenheit von 2 mmol/l EDTA.

3.2.5. TEMPERATUREINFLUSS

Im Serum und in Peak I wurde die PLA-Aktivität bei 27 °C und 37 °C bestimmt (Doppelbestimmung).

Material	PLA	
	U/l bei 27 °C	U/l bei 37 °C
Serum pH 6,5	28	41
Serum pH 8,0	46	67
Peak I	70	85

Tab.9: Temperatureinfluß auf die PLA-Aktivität in Serum und Peak I.

Die Aktivität war bei 37 °C im Serum um den Faktor 1,5 und in Peak I um den Faktor 1,2 höher als bei 27 °C (s.Tab.9).

3.2.6. DICHTEBESTIMMUNG IM SERUM

Um die Ursache für das überraschend hohe Molekulargewicht der Peak-I-PLA zu finden, wurde Serum (400 µl) mit einer Ausgangsaktivität von etwa 70 U/l auf einen kontinuierlichen Kalium-Bromid-Gradienten (s.Kap.2.6.) aufgetragen und nach Ultrazentrifugation in den einzelnen Fraktionen die Dichte und PLA-Aktivität bestimmt. Außerdem wurde nach Auftragung von 100 µl IgG (160 mg/l) bzw. 100 µl eines Albumin/IgG-Gemischs (30 mg/l bzw. 160 mg/l) nach jeweils getrennten Zentrifugenläufen die Dichte und Extinktion bei

E_{280} gemessen. Das Ergebnis der verschiedenen Läufe, in ein Bild gezeichnet, zeigt Abbildung 22.

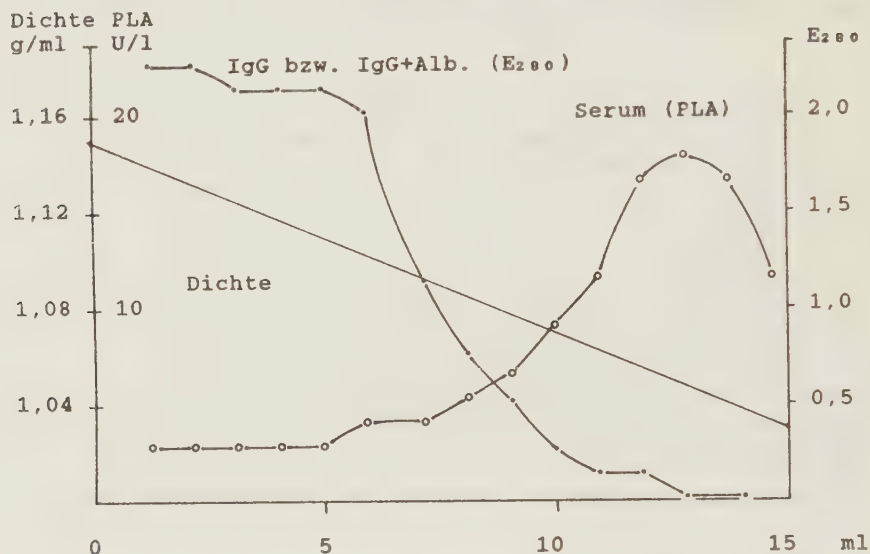


Abb.22: Auftragung von Serum mit PLA-Aktivität, IgG und eines Albumin/IgG-Gemisches auf einen kontinuierlichen KBr-Dichtegradienten mit anschließender Ultrazentrifugation (die 3 Versuche sind in einer Abbildung zusammengefaßt, der Verlauf von E_{280} war bei IgG und bei IgG + Albumin fast identisch und wird nur mit einer Kurve dargestellt).

Die gesamte PLA-Aktivität wurde im Dichtebereich der Lipoproteine wiedergefunden. In der Literatur wird für LDL eine Dichte von 1,006 - 1,063 g/ml beschrieben (55). Wie erwartet, waren Albumin und IgG in einem höheren Dichtebereich zu finden. Es scheint also ein Großteil der Serum-PLA an Lipoproteine gebunden zu sein, womit das hohe MG von Enzympeak I erklärt werden könnte.

3.3. KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.3.1. PLA-MESSUNGEN BEI AUSGEWÄHLTEN KRANKHEITSBILDERN

Zehn Krankheitsverläufe von Patienten aus der anästhesiologischen Intensivstation mit den höchsten Aktivitäten im Serum (s. Kap. 2.1.) wurden näher untersucht. Von diesen 10 Patienten sind 9 auf der Intensivstation verstorben. Einen Überblick über Erkrankung, Todesursache und höchste gemessene PLA-Aktivität während des Krankheitsverlaufs gibt Tab. 10. Diagnosen und Todesursachen sind den Krankenakten der anästhesiologischen Intensivstation entnommen. Eine kurze Auflistung wichtiger Daten aus der Krankengeschichte ist, nach Patient geordnet, im Anhang zu finden.

Alle 10 Patienten wurden maschinell beatmet. Ihre Kreatininspiegel waren zumindest zeitweise über die Norm erhöht. In 3 Fällen wurde eine maschinelle Hämofiltration durchgeführt.

Alle polytraumatisierten Patienten zeigten zu Beginn keine oder nur gering meßbare Aktivität trotz schwerster Verletzungen. Bei allen tödlich endenden Krankheitsverläufen nahm die Aktivität gegen Ende zu, teilweise wurde ein leichtes Absinken in den letzten Tagen beobachtet. Dabei stieg bei 3 von 7 Patienten in den Tagen vor dem Tode besonders die "alkalische" Form an (s. Abb.23). Bei 3 Patienten war keine Unterscheidung der PLA nach pH-Wert möglich, da nur bei pH 8,0 gemessen wurde.

Bemerkenswert war ferner ein zweigipfliger Verlauf der Aktivität bei 6 der obigen Intensivpatienten, es wurde sogar in 3 Fällen ein zwischenzeitliches Absinken der PLA unter 10 U/l, also in den Normalbereich, vermerkt (vgl. An-

Diagnose	Todesursache	Höchste Aktivität U/l
Schenkelhalsfraktur mit postoperativen Komplikationen	Hypoxisches Herz-Kreislaufversagen	753
Polytrauma	Septisch-toxisches Multiorganversagen	690
Polytrauma	Septisch-toxisches Kreislaufversagen	690
Polytrauma	Hypoxisches Herz-Kreislaufversagen	660
Polytrauma	Multiorganversagen	224
Peritonitis (perforiertes Ulcus)	Hypodynames Herz-Kreislaufversagen	224
Polytrauma	Hypoxisches Herz-Kreislaufversagen	216
Polytrauma	Toxisch-hypox. Herz-Kreislaufversagen	205
Peritonitis (Mesenterialinfarkt)	Septisch-tox. Herz-Kreislaufversagen	119
Akute Pankreatitis	—	117

Tab.10: Diagnose, Todesursache und höchste gemessene Werte von 10 Intensivpatienten.

hang).

Auffallend war weiterhin ein Leukozytenabfall bei gleichzeitiger PLA-Erhöhung gegen Ende bei 6 Krankheitsverläufen, zum Teil mit einem gleichzeitigen Thrombozytenabfall begleitet (s. Abb. 24). In der Hälfte aller Fälle fand man erhöhte Leukozytenwerte bei hoher PLA, der Verlauf war aber nicht parallel.

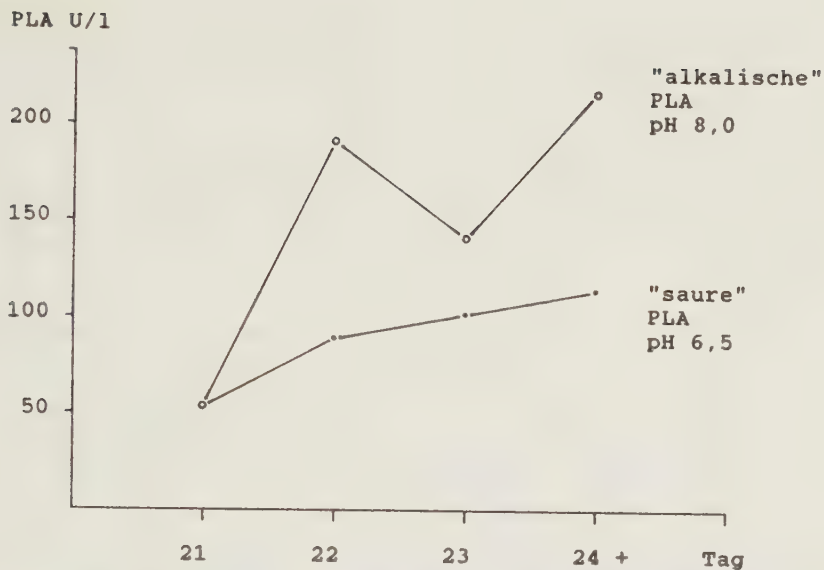


Abb.23: Patient F.K., m, 66 Jahre, Polytrauma: Anstieg besonders der "alkalischen" PLA in den letzten Tagen vor dem Tode.

Ein Blick auf die Pankreasenzyme zeigt erhöhte PLA-Werte bei normalen oder nur gering erhöhten Lipase- oder Amylasewerten in drei Fällen. Interessanterweise war die "saure" PLA nur bei stärkerer Pankreasbeteiligung erhöht (vgl. Anhang). Die Lipase- oder Amylaseerhöhung ergab keine Korrelation zum Anstieg der PLA-Aktivität oder zum Quotienten der Aktivität bei pH 8,0 zur Aktivität bei pH 6,5.

In der Literatur wurden erhöhte PLA-Aktivitäten bei rheumatischen Erkrankungen (34,71) und Autoimmunerkrankungen (31,33) beschrieben.

Deshalb wurde im Serum verschiedener Autoimmunerkrankungen

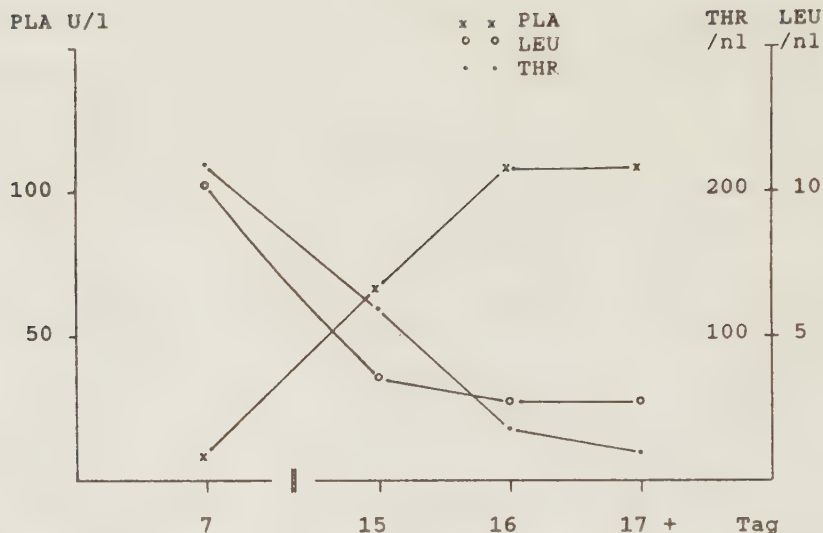


Abb.24: Patient H. T., w, 65 Jahre, Mesenterialinfarkt mit Peritonitis: Abfall der Leukozyten (LEU) und Thrombozyten (THR) bei gleichzeitigem Anstieg der PLA-Aktivität in den letzten Tagen vor dem Versterben.

mit dem Selektivanalyzer Kone Progress die PLA-Aktivität gemessen (Tab.11). Dabei wurde nur bei einem Fall einer schweren Verlaufsform des systemischen Lupus erythematoses, einer Erkrankung, die neben den Hautveränderungen vor allem mit einem Befall innerer Organsysteme einhergeht (7), eine Aktivität über 10 U/l gemessen (höchster Wert bei Verlaufsbeobachtung: 302 U/l). Bei diesem Patienten (m. 44 Jahre) wurde eine Nierenbeteiligung festgestellt und weiterhin eine Hemmkörperphämophilie und Kälteagglutininkrankheit diagnostiziert. In allen anderen Seren wurden Aktivitäten unter 10 U/l bestimmt.

Diagnose	Anzahl der Fälle	PLA-Aktivität (U/l)
Lupus erythematoses integumentalis	4	< 10

Lupus erythematoses visceralis		
Leichtere Verlaufsform	6	< 10
Schwere Verlaufsform	1	302

Zirkumskripte Sklerodermie	4	< 10

Progressiv systemische Sklerodermie		
Leichtere Verlaufsform	5	< 10
Schwere Verlaufsform	6	< 10

Pemphigus vulgaris	4	< 10

Tab.11: Messung der PLA-Aktivität im Serum verschiedener Autoimmunerkrankungen.

3.3.2. CHARAKTERISIERUNG DER PLA AUSGEWÄHLTER PATIENTEN

Das Serum von zwei polytraumatisierten Patienten mit jeweils sehr hohen PLA-Aktivitäten (K.Z. B.M. s. Anhang) wurde auf Sephadex G-150 aufgetragen und die PLA-Aktivität bei pH 6,5 und pH 8,0, E_{405} , Cholesterin und Albumin (immunturbidimetrische Methode) bestimmt.

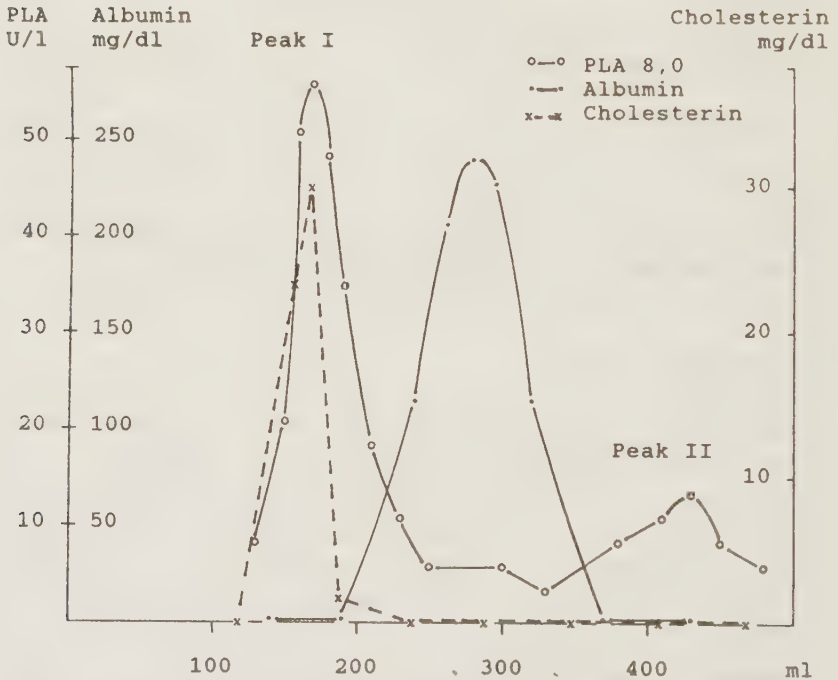


Abb.25: Serum eines polytraumatisierten Patienten (B. M.) mit sehr hoher PLA-Aktivität (620 U/l) auf Sephadex G-150.

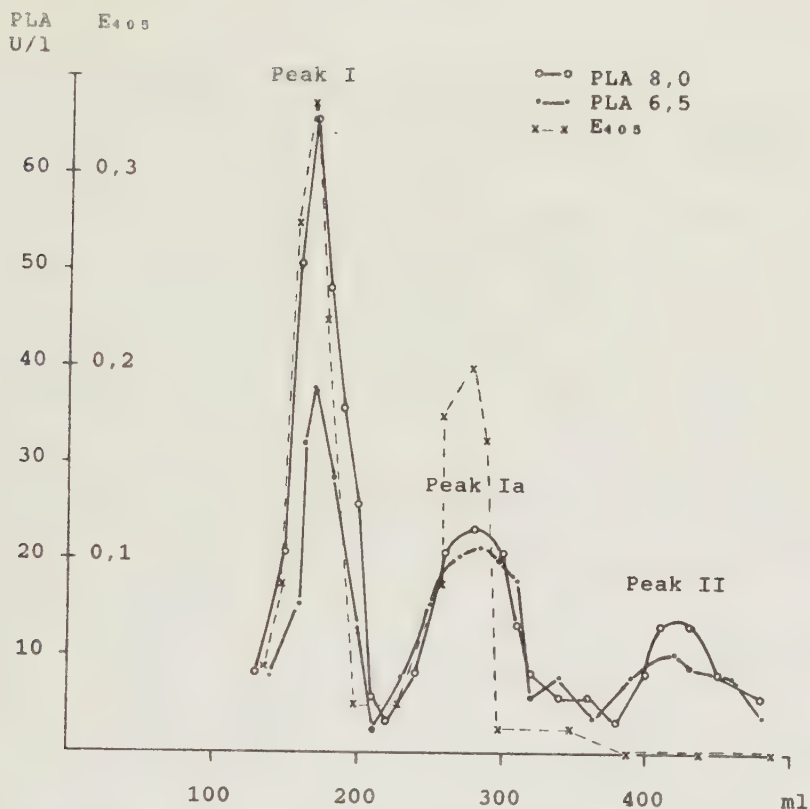


Abb.26: Serum eines polytraumatisierten Patienten (K. Z.) mit sehr hoher PLA-Aktivität (690 U/l) auf Sephadex G-150.

In Abb. 25 sieht man ebenso wie in Abb.12 zwei PLA-Peaks. Die Albuminkonzentration zeigte einen Gipfel kurz vor dem Ovalbumin (s.Abb.10), während die Cholesterinkonzentration mit Aktivitätspeak I zusammenfiel. Auffällig war der Kurvenverlauf der PLA-Aktivität in Abbildung 26, denn hier ergab sich ein etwas verbreiteter neuer Peak mit Aktivität (Peak Ia), etwa im Bereich zwischen Aldolase und Ovalbumin. In diesem Peak war die Aktivität bei pH 6,5 nur gering niedriger wie bei pH 8,0.

4. DISKUSSION

4.1. METHODEN ZUR MESSUNG DER PHOSPHOLIPASE-A-AKTIVITÄT

Früher beschriebene Verfahren zur PLA-Aktivitätsmessung (vgl. Review von van den Bosch (97)) wurden zwar in einigen spezialisierten Labors verwendet, konnten aber wegen ihres technischen Aufwandes oft nur von ihren Erstbeschreibern durchgeführt werden.

Besondere Erwähnung verdient in diesem Zusammenhang die erste Messung der Serum-PLA-Aktivität durch Zieve und Vogel (1961), die für eine einzige Bestimmung bis zu 18 Stunden bei einer Reaktionstemperatur von 55 °C benötigte (104). Der dort verwendete Titrationstest zählt zu den ältesten Analysenverfahren zur Bestimmung der PLA-Aktivität. Bei dieser Methode wurde in einigen Arbeiten Eidotter als Substrat verwendet (12,20). Die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens ist jedoch ungenügend, denn vor allem die mit verschiedenen Substratansätzen ("Ei-zu-Ei-Präzision") an derselben Probe bestimmten Aktivitäten wiesen Schwankungen von bis zu 100% auf (3). Für die Titrimetrie kamen neben Eidotter auch definierte Verbindungen wie z.B. Dioctanoyl-Phosphatidylcholin zur Anwendung (27).

1981 wurde von Shakir (83) ein Radioisotopentest beschrieben, bei dem eine 1-C¹⁴-markierte Palmitinsäure aus der 2-Stellung von Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin abgespalten wird. Die freigesetzten Fettsäuren werden mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Dieser Test ist aufwendig und erbringt bei Messungen im Humanplasma nur sehr niedrige Aktivitäten um 0,1 U/l (58).

Bei einem anderen Isotopentest werden als Substrat autokla-

vierte Escherichia-Coli-Bakterien eingesetzt, die in einem mit markierter Ölsäure versetzten Nährmedium angezüchtet werden (17). Diese Bestimmungsmethode liefert im Serum bei einer Inkubationszeit von nur 15 min ausreichende Meßsignale (95). Da die Substratherstellung relativ aufwendig und schwer standardisierbar ist, kam auch diese Methode für die hier vorliegenden Untersuchungen nicht in Frage.

Immunchemische Verfahren wie Radioimmunoassay (62) oder Fluoreszenz-Immunoassay (19) weisen eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität auf. Allerdings werden durch den Antikörper gegen humane pankreatische PLA₂ aktives Enzym und inaktives Proenzym nicht unterschieden (40). Außerdem wird mit diesen Methoden nur die Pankreas-PLA₂ gemessen, während extrapancreatische Erkrankungen wie z.B. septischer Schock nicht erfaßt werden.

Weiterhin werden fluoreszierende Pyrenanaloga synthetischer Phospholipide für die Phospholipasemessung verwendet (29,93). Die Substrate sind bisher mit einer Ausnahme (KSV Chemical Corporation, Helsinki, Finnland) nicht kommerziell erhältlich. Auch bei diesen Methoden werden bei Serummessungen sehr niedrige Aktivitäten erhalten (25,93). Vor der Messung müssen die Reaktionsprodukte wegen störender Matrixeffekte im Serum extrahiert werden (93).

Der in dieser Arbeit verwendete manuelle photometrische Test nach Hoffmann et al. (41,42,43) stellt im Gegensatz zu den oben beschriebenen Verfahren eine leicht zu handhabende Bestimmungsmethode dar, die bei einer Inkubationszeit von nur 18 min auch niedrige Serumaktivitäten erfaßt (vgl. Kap. 2.3.2.1.). Eine Unterscheidung zwischen Normalwert (unter 10 U/l) und deutlich pathologischer Aktivität (über 20 U/l) ist möglich (42). Das in dieser Methode verwendete Substrat

(43) stellt insofern einen Kompromiß hinsichtlich Preis und Standardisierbarkeit dar, als das verwendete gereinigte Phosphatidylcholin aus Sojabohnen im Vergleich zu ungereinigten Naturprodukten (z.B. Eidotter (12,20) oder E.coli (17)) besser definiert und im Vergleich zu synthetischen Substraten wie etwa Dioctanoyl-Phosphatidylcholin (27) erheblich preisgünstiger ist. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien ist möglich, wie es durch eine multizentrische Studie gezeigt wurde (14). Nachteil dieses Tests ist jedoch, daß nicht zwischen PLA_1 - und PLA_2 -Aktivität unterschieden werden kann. Deshalb wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein für PLA_2 spezifischer Isotopentest (70) durchgeführt (vgl.Kap. 2.3.2.3.).

Für eine klinisch-chemische Anwendung wurde die photometrische Bestimmungsmethode an das vollautomatische Analysengerät Kone Progress adaptiert (50) und für Labors, in denen dieses Gerät nicht verfügbar ist, als halbmechanisierte Version entwickelt (vgl.Kap.2.3.2.2.).

Um die PLA-Aktivitätsmessung weiter in die klinisch-chemische Diagnostik zu integrieren, sollten als vordringliche Ziele der Methodenfortentwicklung die Methodik weiter vereinfacht und die Spezifität verbessert werden. Denkbar wäre etwa die Entwicklung eines immunchemischen Tests zur Bestimmung verschiedener PLA-Isoenzyme unterschiedlicher Organherkunft im Serum, vergleichbar z.B. mit der Messung von Kreatinkinase-Isoenzymen im Serum. Einen ersten Schritt in diese Richtung stellt die in dieser Arbeit dargestellte Enzymanreicherung und -charakterisierung dar, da die Reindarstellung der möglicherweise verschiedenen Serumenzyme Voraussetzung für die Gewinnung von Antikörpern ist.

4.2. MOLEKULARGEWICHT DER PHOSPHOLIPASE A IM SERUM

Obwohl das Auftreten aktiver Phospholipase A im Serum schon seit den 60-er-Jahren (104) bekannt ist, sind Arbeiten, die dieses Serumenzym zu charakterisieren versuchen, in der Literatur eher selten (96).

Für die humane sekretorische Phospholipase A findet man in früheren Veröffentlichungen meist ein Molekulargewicht im Bereich von 12-17 kD (96). Bemerkenswert sind einige Ausnahmen: In der Gamma-Globulinfraktion menschlichen Plasmas wurde ein hitzeempfindliches Protein mit PLA₂-Aktivität mit einem MG von 150 kD beschrieben, und in der Bronchiallavage von Patienten mit alveolärer Proteinose, einer chronisch diffusen Lungenerkrankung (72), wurde eine PLA₂ mit einem Molekulargewicht von 75 kD gefunden (Übersicht bei Vadas und Pruzanski (96)). Eine neuere Arbeit charakterisiert eine 73 kD schwere PLA₂ aus Monozyten (85).

In den vorliegenden Untersuchungen wurden durch die Anwendung der Molekularsiebtechnik im Humanserum drei Enzympeaks mit PLA-Aktivität aufgetrennt (vgl. Abb.12 u.26). Überraschenderweise ergab sich für Peak I ein Molekulargewicht von größer 160 kD (s.Abb.10), eine Größe, die unseres Wissens noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Besonders interessant war nun die Frage nach der Ursache dieses hohen Molekulargewichts. Sowohl bei diesem höhermolekularen Peak I als auch bei dem zwischen 40 und 150 kD liegenden verbreiterten Peak Ia könnte es sich um größere Enzyme, d.h. Proteine mit entsprechend hohem Molekulargewicht handeln. Weiterhin wäre ein Zustandekommen der beiden Peaks durch eine Polymerbildung der kleineren etwa 15 kD schweren Form oder durch die Bindung eines kleineren Enzyms an ein größeres Protein oder Lipid denkbar. Der Peak Ia könnte

auch ein Bruchstück der höhermolekularen Form sein. Aus der Literatur ist eine besondere Bindungsfähigkeit der PLA₂ an hydrophobe Grenzflächen bekannt (48,59). Waite betont die Neigung der Phospholipasen zur Aggregation oder Bindung an Lipide auf Grund ihrer hydrophoben Natur (100). Deshalb erschien eine "Molekülaggregat-Theorie" am wahrscheinlichsten.

Die IgG-Bestimmungen (s.Abb.12) ergaben 2 Konzentrationsgipfel, von denen der eine im Bereich des in der Literatur angegebenen MG von 150 kD für IgG (28) lag. Ein weiterer Gipfel fiel mit Enzympeak I zusammen. Die Theorie, daß aggregierte IgG-Moleküle selbst PLA-Aktivität besitzen, erscheint nach dem heutigen Kenntnisstand eher unwahrscheinlich (94). Die Bildung eines "cytotoxischen" Komplexes aus PLA und Immunglobulin sowie evtl. anderen Proteinen der Entzündungsabwehr wäre allerdings durchaus diskutierenswert (94).

Zu einem unterschiedlichen Ergebnis führte die Bestimmung der Konzentration von Albumin, das ebenfalls die PLA binden könnte (s. Abb. 11 u. 25). Mit Bromcresolgrün ergaben sich zwei "Albumin"-Peaks, der erste bei PLA-Peak I, der zweite etwa an der in der Literatur angegebenen Stelle bei 66 kD (28). Nur an letzterer Position wurde auch mit der immunchemischen Methode (44) ein Konzentrationsgipfel gemessen. Dieser Befund ist ohne weitere Untersuchungen nicht zu erklären. Folgende Möglichkeiten sind denkbar: Albumin könnte in höhermolekulare Aggregate wie z.B. Lipoprotein X (28) so eingeschlossen sein, daß antigene Determinanten nicht zugänglich sind. Dadurch würde die Reaktion mit Anti-Humanalbumin-IgG behindert, während das wesentlich kleinere Bromcresolgrün mit einem MG von 720 D (23) noch gebunden würde. Alternativ könnte es sich um ein "Pseudoal-

bumin" handeln, ein Protein, das unspezifisch mit Bromcresolgrün reagiert. In dem von uns verwendeten Test mit einer Reaktionszeit von nur 30 sec ist dies allerdings eher unwahrscheinlich, da die "Pseudoalbumine" nur schwach und träge mit Bromcresolgrün reagieren (75).

Die Theorie einer Aggregatbildung wurde auch durch die Molekulargewichts-Studien mit der SDS-Gelelektrophorese gestützt. Obwohl für die Anreicherung nur die Fraktionen von Peak I nach Molekularsiebtechnik weiterverwendet wurden, zeigte sich beim Elektrophoreselauf neben den höhermolekularen Banden eine einzige aber deutliche Bande im niedermolekularen Bereich bei 15 kD (vgl. Abb.18). Diese Beobachtung könnte auf ein Gleichgewicht zwischen höhermolekularer Struktur mit PLA-Aktivität und kleinem freigesetzten Enzym (15 kD) hindeuten, das sich im Serum und auch erneut in den angereicherten Fraktionen einstellt.

Den entscheidenden Hinweis ergab eine Dichtebestimmung mit einem kontinuierlichen KaliumBromid-Dichtegradienten, bei der die gesamte PLA-Aktivität im Dichtebereich der Lipoproteine gefunden wurde (vgl. Abb. 22). Mit diesem Ergebnis wären sowohl das hohe Molekulargewicht von Enzympeak I als auch der in dessen Bereich gemessene Cholesterinpeak (s. Abb.25) in Einklang zu bringen. Albumin und Immunglobulin G wurden wie erwartet in einem höheren Dichtebereich gefunden, in dem sich keine PLA-Aktivität befand. Vermutlich ist also der größte Teil der Phospholipase A im Serum an Lipoproteine gebunden.

4.3. ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER SERUM-PLA - HINWEISE AUF DAS VORLIEGEN VON SUBPOPULATIONEN

Im Gegensatz zu den klinisch-chemischen "Standardenzymen" wie z.B. Lactatdehydrogenase oder alkalische Phosphatase kommt die PLA im normalen Serum so gut wie nicht vor (42), und auch bei entzündlichen Krankheitsbildern mit starker PLA-Erhöhung ist die Enzymmenge im Vergleich zu den Hauptproteinen des Serums mit ca. 0,1 mg/l verschwindend gering. Ein wesentliches Problem bei der Anreicherung bestand deshalb in der Konzentrierung des Ausgangsmaterials. Die vorliegenden Versuche haben gangbare Lösungswege aufgezeigt, führten jedoch weder einzeln noch in Kombination zu Aktivitäten von mehreren 1000 U/l, wie sie für ein Reinigungsverfahren wünschenswert gewesen wären.

Die Schwefelsäurefällung, kombiniert mit einem Hitzeschritt, erwies sich als besonders geeigneter Vorreinigungsschritt zur Anreicherung der PLA (s.Tab.3). Die Widerstandsfähigkeit dieses Enzyms ist aus der Literatur bekannt (8,18,53), so weist z.B. Nevalainen (60) auf die hohe Säure- und Hitzestabilität der Pankreas-PLA₂ hin. Durch eine anschließende Aceton/Methanol-Fällung (s.Tab.4), die in ähnlicher Form bei der Reinigung von PLA₂ aus Duodenalsaft eingesetzt wurde (53), gelang die Herstellung eines Pulvers mit PLA-Aktivität. Mit diesem Verfahren ist eine etwas bessere Konzentrierung der Aktivität möglich als mit den weiter unten diskutierten Methoden zur Volumeneinengung. Weitere Untersuchungen, ob dieses Pulver mit Aktivität für eine Reinigung verwendet werden kann, sind notwendig.

Die Fällung mit Ammoniumsulfat, erfolgreich eingesetzt z.B. bei der Reinigung von PLA₂ aus Pankreasgewebe (18,98), oder Duodenalsaft (53), erbrachte für eine Anreicherung oder

Konzentrierung der PLA aus dem Serum nur unzureichende Resultate.

Wegen der geringen Aktivität im Serum wurden mehrere Methoden zur Volumeneinengung erprobt. Diese Verfahren ergaben jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse (vgl. Kap. 3.1.3.). Lyophilisieren stellte sich als beste Konzentrierungsmethode dar, allerdings nur bei einer Volumenabnahme etwa um den Faktor 3. Versuche, stärker zu konzentrieren, führten zu sehr hohen Verlusten der Enzymaktivität.

Auffällig ist in diesem Zusammenhang, daß die PLA bei eher schonenden Verfahren zur Volumeneinengung erheblich an Aktivität verlor, aber unter denaturierenden Bedingungen wie z.B. bei der Schwefelsäurefällung eine erstaunliche Stabilität zeigte. Denkbar ist, daß durch Veränderungen der Serummatrix bei der Einengung der eingangs postulierte Molekülkomplex zerstört wird. Weiterhin ist zu diskutieren, ob dieser Verlust auch als Hemmung durch Serum-Inhibitoren, die bei Volumeneinengung stärker wirksam werden können, zu interpretieren ist. Nach Chang et al. (8) unterliegt die PLA₂ einem komplexen gewebeabhängig modulierten Regulationssystem von Aktivatoren und Inhibitoren. Hemmstoffe verhindern, daß sich die potentiell toxische Phospholipase A, die z.B. im Rahmen der Abwehr körperfremder Zellen lebenswichtige Funktionen erfüllt, gegen den eigenen Körper wendet (40). Eine Reihe von Proteinen wie etwa Macroctin (21,22), Lipomodulin (1,34,35,77), Calpactin (11), Uteroglobulin (54) oder das in der Niere vorkommende Renocortin (10,76) wurden als natürliche Inhibitoren der PLA gefunden.

Die angereicherte PLA₂ aus dem Duodenalsaft wurde sehr gut auf dem Kationenaustauscher CM-Sepharose CL-6B gebunden (53). Aus diesem Grund wurde dieses Gel auch für die Anrei-

cherung des Serumenzyms verwendet (s.Kap.3.1.2.). Nach Auf-
tragung von Serum wurden etwa zwei Drittel der erhaltenen
Aktivität gebunden. Eine Reihe von Versuchen schloß eine
Überlastung der Säule aus.

Ein ebenfalls unterschiedliches Bindungsverhalten der PLA
zeigte sich bei der hydrophoben Interaktionschromatographie
(s.Abb.17). Es sei die gute Bindung von angereicherter PLA₂
aus dem Duodenalsaft auf Octyl-Sepharose Cl-4B gegenüberge-
stellt (53).

Diese Ergebnisse weisen auch unter Berücksichtigung der
unterschiedlichen pH-Optima der gebundenen und ungebundenen
Fraktion auf das Vorkommen von mindestens zwei unterschied-
lichen PLA-Formen im Serum hin, die sich hinsichtlich
Ladung und Hydrophobizität zu unterscheiden scheinen. Eine
endgültige Beurteilung wird erst möglich sein, wenn es
gelingt, diese Formen als homogene Proteinfractionen rein
darzustellen. Nach überschlägiger Berechnung würden für die
Gewinnung von 1 mg Reinenzym bei 100 % Ausbeute allerdings
etwa 20 Liter Serum von schwerkranken Patienten mit
beispielsweise 50 U/l benötigt. Dieses Serumvolumen stand
im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung.

Bisher wurden Reinigungen menschlicher PLA aus Pankreasge-
webe (18,56,98) und Duodenal- (53) oder Pankreassaft (20,
26,27) beschrieben. Die spezifische Aktivität im Ausgangs-
material dieser Reinigungen ist dabei erheblich höher als
im Serum. Bei der vorliegenden Reinigung wurde die auf dem
Kationenaustauscher ungebundene Fraktion 100-fach, die ge-
bundene 563-fach angereichert (Vgl.Tab.6).

Die spezifische Aktivität von 0,16 U/mg Protein und die
SDS-Gelelektrophorese der ungebundenen PLA (vgl. Abb. 18)
zeigten, daß trotz Anreicherung weiterhin ein Proteinge-

misch vorlag. Wie bei Weiterverwendung von Peak I nach Molekularsiebtechnik zu erwarten war, fanden sich bei der Elektrophorese vor allem Banden im höhermolekularen Bereich. Die größte Bande lag aber im Albuminbereich mit einem MG von ca. 60 kD (28). Möglicherweise befanden sich in Peak I nach Molekularsieb Albuminkomplexe, die sich unter der Einwirkung von SDS (66) in Untereinheiten d.h. in das ursprüngliche Albuminmolekül auflösten. Ebenfalls denkbar wäre, daß diese 60-kD-Bande ein Tetramer der kleinen PLA darstellt. Da eine PLA-Aktivitätsbestimmung nach SDS-Gelelektrophorese nicht möglich war, konnte die Natur der 60-kD-Bande mit dem vorliegenden Versuchsansatz nicht geklärt werden.

Auffällig war die bessere Bindung der rohen Serum-PLA auf CM-Sepharose im Vergleich zum angereicherten Enzym aus Peak I nach Molekularsieb (vgl. Abb. 13 u. 15). Es ist deshalb zu vermuten, daß der Kationenaustauscher bevorzugt niedermolekulare PLA bindet. Damit in Einklang steht die Beobachtung einer guten Bindung von angereicherter PLA₂ aus Duodenalsaft mit einem MG von etwa 15 kD auf CM-Sepharose (53). In den gebundenen Fraktionen wurde die PLA erheblich stärker angereichert, konnte jedoch nicht näher charakterisiert werden. Bei den sehr niedrigen Konzentrationen wären für eine weitere Reinigung, Elektrophorese etc. große Mengen dieser Peakfraktion nötig gewesen, die bei der vorliegenden Präparation nicht anfielen.

Die Messungen mit dem Isotopentest ergaben ein überwiegendes Vorkommen von PLA₂ sowohl im Serum als auch in den angereicherten höhermolekularen Serumfraktionen (s. Tab. 8). Dieses Ergebnis in Verbindung mit den Aussagen früherer Arbeiten (96) weist darauf hin, daß es sich bei der sekreto-

rischen PLA vermutlich um eine Phospholipase A₂ handelt. Das für die angereicherte Peak-I-PLA bestimmte pH-Optimum von pH 7 (s. Abb. 19) ist etwas überraschend, denn das Ausgangsmaterial stammte aus dem "alkalischen Pool". Zwei Erklärungen bieten sich an: entweder wurde nach Molekularsieb die "alkalische" Form des Enzyms zerstört oder das pH-Optimum änderte sich. In der Literatur wurde bisher für sekretorische PLAsen ein breites Optimum im Bereich von pH 6,5-9,0 angegeben (42,96). Temperaturveränderungen beeinflussen die PLA-Aktivität nicht nur durch direkte Wirkung auf das Enzym, sondern auch durch Veränderungen der "Molekülarchitektur" des Substrats (8). Bemerkenswert bei unseren Untersuchungen war ein größerer Temperatureinfluß auf die Aktivität im Serum als auf die Aktivität von Peak I (s. Tab.9). Die mehrfach in früheren Arbeiten (8,42,96) angegebene Kalziumabhängigkeit der sekretorischen PLA und ihre völlige Hemmung durch kalziumbindende Inhibitoren konnte auch für die Peak-I-PLA gezeigt werden (s. Abb. 21).

Zusammenfassend kann man sagen, daß durch die beschriebene Anreicherung eine höhermolekulare Struktur mit PLA-Aktivität gefunden wurde, bei der es sich wahrscheinlich um einen Lipoprotein-PLA-Komplex handelte und die vermutlich zumindest für einen Teil der erwähnten Auffälligkeiten der Serum-PLA und auch der Schwierigkeiten bei der Anreicherung verantwortlich war. Für eine Reinigung der PLA aus dem Serum bis zur Homogenität ist eine weitere Erforschung der Struktur dieses Moleküls oder Molekülaggregats notwendig. Weiterhin ergaben sich deutliche Hinweise für das Vorkommen verschiedener PLA-Subpopulationen im Serum. Der Frage nach der Quelle dieser Enzymformen und ihrer klinischen Bedeutung wird im nächsten Kapitel nachgegangen.

4.4. PATHOPHYSIOLOGISCHE UND KLINISCHE ASPEKTE

Zum Zeitpunkt der hier vorgelegten Experimente nahmen die meisten Untersucher eine pankreatische Herkunft der Serum-PLA an (60,61,82). Einige Autoren beschrieben ein Vorkommen von PLA in Leukozyten (2,24,99) oder Makrophagen (85,96), ohne daß aber experimentell belegt werden konnte, daß diese Zellen eine Enzymquelle der Serum-PLA darstellen. In allerjüngster Zeit wurden Zweifel an der pankreatischen Herkunft des Serumenzyms publiziert (96). Die im folgenden diskutierten Versuche legen den Verdacht nahe, daß stark erhöhte PLA-Aktivitäten im Blut nicht auf das Vorhandensein eines einzelnen Enzyms eindeutiger Herkunft zurückzuführen sind. Für die Pankreas-PLA wurde in früheren Arbeiten ein pH-Optimum um pH 6,5 bestimmt (27,42,98). Dieser Wert konnte für gereinigte PLA₂ aus dem Duodenalsaft in etwa bestätigt werden (s. Kap.3.2.2.). Da außerdem die eindeutig "saure" PLA (Quotient pH 8,0/pH 6,5 unter 0,7) nur bei Erkrankungen mit stärkerer Pankreasbeteiligung nachweisbar war (vgl.Anhang), wurde als Herkunftsorgan der "sauren" PLA im Serum auch nach den hier vorgelegten Untersuchungen das Pankreas angenommen. Die PLA in Peak II nach Molekularsiebtechnik besaß etwa die gleiche Größe wie das aus Pankreasgewebe (18,56,98) und -saft (20,26,27) gereinigte und charakterisierte Enzym mit etwa 14-15 kD. Interessant war, daß nach dem Auftragen von Serum, in dem ein Aktivitätsoptimum im sauren Bereich gemessen wurde, die Aktivität in Peak II nur noch bei pH 6,5 meßbar war (s. Abb.9). Das Enzym in Peak II könnte also bei einem Serum aus dem "sauren Pool" pankreatischer Herkunft sein.

Bei den in Kap. 3.3.1. und 3.2.2. beschriebenen Krankheitsbildern ergab sich jedoch ein wesentlich häufigeres Auftre-

ten der "neutralen" oder sogar "alkalischen" PLA. Meist war bei diesen Erkrankungen keine schwerere Schädigung des Pankreas nachweisbar. Anders als bei der Verwendung von Serum aus dem "sauren Pool" zeigte der PLA-Peak II ein eindeutig alkalisches Optimum nach dem Auftrennen von Serum aus dem "alkalischen" und auch aus dem "neutralen" Pool (Abb.12). Aus einem Molekulargewicht von 15 kD kann deshalb nicht zwingend eine pankreatische PLA-Herkunft abgeleitet werden. Eine 15 kD schwere humane PLA₂ mit einem pH-Optimum von pH 7,5 wurde auch in der Samen- (96) bzw. Synovialflüssigkeit gefunden (89).

In der Literatur wurde eine potentielle Hemmung der PLA₂ durch Antikörper beschrieben (57). Das auffälligste Ergebnis unserer eigenen PLA-Hemmversuche war, daß die Aktivität sowohl im Serum als auch in Peak I nach Molekularsieb nicht durch Antikörper gegen humane Pankreas-PLA₂ beeinflußt wurde, während eine Hemmung der angereicherten PLA₂ aus Duodenalsaft möglich war (vgl.Kap.3.2.4.). Dies führt zu der Vermutung, daß sich zumindest ein Teil der Serum-PLA immunchemisch von der Pankreas-PLA unterscheidet und scheint ein wichtiger Hinweis für einen extrapankreatischen Ursprung der höhermolekularen Struktur mit PLA-Aktivität zu sein. Die fehlende Hemmung der Serum-PLA wäre aber auch durch Aggregatbildung erklärbar. So könnte z.B das die PLA bindende Trägermolekül eine antikörperprotektive Wirkung besitzen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an 10 vorwiegend polytraumatisierten Intensivpatienten mit sehr hoher PLA-Aktivität im Serum (s. Kap. 3.3.1.) stehen in Einklang mit früheren Veröffentlichungen. In den Reviews von Hostetler (45) bzw. Vadas et al. (96) wird auf die Bedeutung der Phospho-

lipase A₂ bei gram-negativ septischem Schock und anderen Infektionskrankheiten, sowie beim ARDS ("adult respiratory distress syndrome") hingewiesen. Außerdem wurden erhöhte Aktivitäten als Indikator für eine schlechte Prognose des Intensivpatienten beschrieben (50,51,91) und eine fehlende Korrelation zwischen Lipase- oder Amylaseerhöhung und Anstieg der PLA-Aktivität im Serum beobachtet (42,79,80). Auffällig bei den Verlaufsbeobachtungen der vorliegenden Arbeit war ein Ansteigen der PLA, häufig der "alkalischen Form", in den letzten Tagen vor dem Tode, in der Mehrzahl der Fälle von einem gleichzeitigen Leukozytenabfall begleitet (vgl. Abb.23 u. 24). Dieses Enzym, das vermutlich aus einer anderen Quelle als dem Pankreas stammt, könnte also zumindest teilweise für die lebensbedrohliche gesundheitliche Verschlechterung des Patienten verantwortlich sein. Sowohl durch das Enzym selbst, als auch durch die entstehenden Lysophosphatide und freigesetzten Fettsäuren kann es zur massiven Beeinträchtigung zellulärer Funktionen und Organsysteme kommen (96). Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Beobachtung bestätigt (vgl.Anhang), daß bei polytraumatisierten Patienten die PLA-Aktivität am ersten Behandlungstag unter 10 U/l, also im Normalbereich, lag und erst im weiteren Verlauf anstieg (52). Bei diesen Patienten stellt sich die Frage, ob die PLA aus Entzündungszellen freigesetzt wird oder aus einer anderen Quelle wie etwa traumatisiertem Gewebe stammt. In beiden Fällen wäre die geringe Aktivität in den ersten Tagen durch eine noch ausreichende Kontrolle durch Inhibitoren erklärbar. Bei einer ganz anders gearteten Gruppe von Erkrankungen, nämlich verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wurden ebenfalls erhöhte Aktivitäten gefunden (31,33,71). Hirata et al. (34) beobachteten im Serum von Patienten mit rheuma-

tischen Erkrankungen Antikörper gegen Lipomodulin, einem natürlichen Hemmstoff der PLA. Auch unsere Untersuchungen ergaben bei einer schweren Verlaufsform des systemischen Lupus erythematodes (LE) erhöhte Werte (vgl. Tab. 11). Darüberhinaus fanden sich aber bei leichten Verlaufsformen des systemischen LE, bei LE integumentalis, Sklerodermie und Pemphigus vulgaris keine erhöhten Aktivitäten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß erhöhte PLA-Aktivitäten im Serum bei LE ähnlich wie bei Pankreatitis (37,38,80,96) und septischem Schock (51,91,95) auf eine schwere und generalisierte Verlaufsform der Erkrankung hinweisen, während dagegen selbst schwere Ausprägungen von Sklerodermie und Pemphigus vulgaris keine Enzymerhöhung zeigen. In einer früheren Arbeit wurde auch in der Bläschenflüssigkeit der Hauterscheinungen bei Pemphigus vulgaris keine Aktivität festgestellt (96).

Im vorliegenden Kapitel wurden eine Reihe von Hinweisen für eine unterschiedliche Quelle der Serum-PLA diskutiert. Eine Erhöhung dieses Enzyms zeigte sich bei teilweise ganz unterschiedlichen, aber stets schwereren entzündlichen und den ganzen Organismus in Mitleidenschaft ziehenden Erkrankungen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Herkunft der Serum-PLA und ihre pathophysiologische und klinische Bedeutung zu klären. Dies wird nicht nur zu einem besseren Grundlagenverständnis dieses Enzyms führen, sondern möglicherweise für den Kliniker diagnostische und therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In methodischen Vorversuchen wurde die manuelle und die vollmechanisierte photometrische Bestimmungsmethode zur Aktivitätsmessung der Phospholipase A durch Ermittlung der Präzision in Serie und von Tag zu Tag überprüft. Weiterhin wurde der photometrische Test für eine halbmechanisierte Routinebestimmung modifiziert.

Bei Versuchen, die PLA aus dem Serum anzureichern, wurde eine Schwefelsäure/Hitzefällung als optimal geeigneter Vorreinigungsschritt gefunden. Durch eine anschließende Aceton/Methanol-Fällung gelang die Umwandlung in ein Pulver mit PLA-Aktivität, das sich für eine bessere Konzentrierung eignete. Versuche mit Ammoniumsulfat erbrachten keine zufriedenstellenden Resultate. Ebenso unzureichende Ergebnisse erzielten verschiedene Techniken zur Volumeneinengung wie Lyophilisieren, Ultrafiltration oder Dialyse gegen Polyäthylenglycol. Experimente sowohl mit einem Kationenaustauscher wie mit hydrophober Interaktionschromatographie wiesen auf ein Vorkommen von mindestens zwei PLA-Unterformen hin, da jeweils nur ein Teil der Serum-PLA gebunden werden konnte. Mit dem Molekularsieb wurden im Serum drei Peaks mit PLA-Aktivität und jeweils unterschiedlichem Molekulargewicht aufgetrennt. Der erste Peak zeigte überraschenderweise ein Molekulargewicht von größer 160 kD. In einigen Fällen wurde in Seren mit sehr hoher Aktivität ein zweiter verbreiteter Peak mit PLA-Aktivität mit einem MG von ca. 40 - 150 kD gefunden. Für die PLA-haltigen Fraktionen mit der geringsten Wanderungsgeschwindigkeit wurde ein MG von etwa 15 kD ermittelt. Eine Kombination der einzelnen

Schritte erbrachte für die an Kationenaustauscher nichtbindende PLA eine 100-fache und für das bindende Enzym eine 563-fache Anreicherung. Die anschließende SDS-Gelelektrophorese ergab mehrere Proteinbanden im höhermolekularen Bereich und etwa bei 60 und 15 kD.

Die höhermolekulare Struktur mit PLA-Aktivität nach Molekularsieb (Peak I) wurde näher charakterisiert. Für dieses Enzym wurde ein pH-Optimum von etwa pH 7 bestimmt. Eine Messung mit radioaktiv markiertem Substrat in dieser höhermolekularen Fraktion und auch im Nativserum ergab, daß es sich größtenteils um PLA₂ handeln dürfte. Durch EDTA konnte die Aktivität der Peak-I-PLA völlig gehemmt werden, eine Reaktivierung durch Kalzium war möglich. Keine Hemmung der Aktivität war mit Antikörper gegen humane Pankreas-PLA₂ zu erreichen, wohingegen gereinigte PLA₂ aus Duodenalsaft mit diesen Antikörpern gehemmt werden konnte. Die Aktivität dieser Peak-I-PLA reagierte weniger stark auf Temperaturerhöhung von 27 auf 37 °C als die PLA im nicht fraktionierten Serum. Konzentrationsbestimmungen in den einzelnen Fraktionen nach Molekularsieb ergaben ein Zusammentreffen von Peak I und dem Serum-Cholesterinpeak. Albumin und IgG zeigten jeweils 2 Gipfel, von denen der erste ebenfalls mit Peak I koinzidierte. Mit einem kontinuierlichen Kaliumbromid-Dichtegradienten wurde festgestellt, daß sich ein Großteil der PLA-Aktivität im Dichtebereich der Lipoproteine befand. Eine Bindung der Serum-PLA an Lipoproteine würde das hohe Molekulargewicht der Peak-I-PLA erklären.

Die Krankheitsbilder von 10 Intensivpatienten mit den höchsten während dieser Arbeit beobachteten Aktivitäten im Serum wurden näher untersucht. Meist handelte es sich um

polytraumatisierte Patienten mit schlechter Lungen- und Nierenfunktion. Außerdem wurden zwei Peritonitisfälle und eine Pankreatitis diagnostiziert. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich, daß eine stärkere PLA-Erhöhung einen prognostischen Indikator einer bevorstehenden Verschlechterung darstellt, denn 9 dieser Patienten verstarben kurze Zeit nach einem Ansteigen dieses Enzyms. Auffällig war, daß in den ersten Tagen nach einem Trauma keine oder nur geringe Aktivität meßbar war, in den letzten Tagen vor dem Tode die PLA, besonders die "alkalische" Form, anstieg und zwischenzeitlich bei mehr als der Hälfte der Patienten ein Abfall der Aktivität teilweise bis in den Normalbereich zu verzeichnen war. Bei der Mehrzahl der Fälle war die PLA-Erhöhung gegen Ende von einem Leukozytenabfall, seltener von einem Thrombozytenabfall begleitet. Interessanterweise war die "saure" PLA nur bei stärkerer Pankreasbeteiligung erhöht. Die PLA-Erhöhung korrelierte nicht mit einem Lipase- oder Amylaseanstieg.

Weiterhin wurde die PLA-Aktivität in Seren mit Autoimmunerkrankungen bestimmt. Beim systemischen Lupus erythematoses schien eine PLA-Erhöhung auf einen schwereren Verlauf dieser Erkrankung hinzuweisen, während dagegen keine Aktivitäten sowohl bei Sklerodermie als auch bei Pemphigus vulgaris gefunden wurden.

6. ANHANG

INTENSIVPATIENTEN MIT SEHR HOHEN PLA-AKTIVITÄTEN IM SERUM

Die aufgeführten Angaben und Daten wurden den Krankenakten der anästhesiologischen Intensivstation des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen entnommen.

Folgende zusätzliche Abkürzungen werden im Anhang verwendet: LIP = Lipase, AMY = Amylase, GGT = Gamma-Glutamyltransferase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, CRE = Kreatinin, LEU = Leukozyten, THR = Thrombozyten.

Normalbereiche der Laborwerte: PLA <10U/l, LIP bis 190 U/l, AMY bis 34 U/l, GGT m 6-28 U/l w 4-18 U/l, GPT bis 24 U/l, CRE 0,7-1,2 mg/dl, Leu 4-10/nl, THR 150-400/nl (Die Angaben sind aus der Tabelle der Normalbereiche klinisch-chemischer Befunde in den Städtischen Krankenhäusern Münchens entnommen).

1) B. M., m, 25 J.

Anamnese:

Mopedunfall

Diagnosen:

- Schädel-Hirntrauma (Unterkieferverdrachtung 11. Tag)
- Tiefe Bein- und Beckenvenenthrombose li. (Thrombektomie 24. Tag)
- Postoperativ Lungenödem und Herz- Kreislaufstillstand
- Respiratorische Insuffizienz im Intervall (kontrollierte maschinelle Beatmung seit 24. Tag)
- Bronchopneumonie

Laborwerte:

Tag	PLA U/l	LIP U/l	AMY U/l	GGT U/l	GPT U/l	CRE mg/dl	LEU /nl	THR /nl
	pH 8,0							
2	18	-	-	91	36	1,0	9,6	-
37	584	393	-	111	24	1,8	9,3	229
38	660	233	13	106	29	1,9	7,2	269
39	355	701	24	95	29	2,1	7,8	253
40 +	-	-	-	-	-	2,3	7,0	200

Todesursache: Hypoxisches Herz- Kreislaufversagen

2) F. K., m, 66 J.

Anamnese:

Autounfall

Diagnosen:

- Schädel-Hirn-Trauma
- Thoraxtrauma mit Rippenfrakturen, Lungenkontusion und Hämothorax (kontrollierte maschinelle Beatmung)
- Bauchtrauma mit Milzruptur (Milzexstirpation), Zwerchfell- und Lebereintrissen (Sonographie am 22.Tag: Pankreasregion unauffällig)
- Frakturen an Becken und unterer Extremität

Laborwerte:

Tag		PLA U/l	LIP U/l	AMY U/l	GGT U/l	GPT U/l	CRE mg/dl	LEU /nl	THR /nl	
	pH	8,0	6,5							
2		<10	-	148	118	20	52	0,9	12,6	78
10		<10	-	-	-	21	1,1	25,7	177	
15		11	-	648	88	270	18	2,0	18,9	286
20		10	18	479	58	241	41	1,5	19,2	213
21		57	58	666	87	233	28	1,6	16,8	180
22		176	91	376	32	199	24	2,1	16,3	180
23		140	96	304	24	163	22	1,6	13,4	177
24 +		216	109	324	28	-	31	2,2	-	-

Anmerkung: Ab 2. Woche Hämodifiltration

Todesursache:

Hypoxisches Herz-Kreislaufversagen

Pathologie:

- Septikopyämie mit Abscheidungsabszessen in Myokard und Nieren
- Bronchopneumonie bei Schocklunge
- Kleine Einblutungen in das Pankreasgewebe des Schwanzes (Histologie: unauffällig)

3) H. T., w, 65 J.

Anamnese:

Abdominelle Symptomatik

Diagnosen:

- Infarkt der Arteria mesenterica superior, Dünndarmgangrän (Subtotale Dünndarmresektion am 1. Tag, Embolektomie am 2. Tag, CT am 15. Tag: Unauffällige Oberbauchorgane, Adhäsionolyse und Revision der Anastomose am 16. Tag)
- Durchwanderungsperitonitis

- Teilinfarkt der Arteria cerebri media re.
- Respiratorische Insuffizienz (kontrollierte Beatmung)

Laborwerte:

Tag	PLA U/l	LIP U/l	AMY U/l	GGT U/l	GPT U/l	CRE mg/dl	LEU /nl	THR /nl	
	pH 8,0	6,5							
2	51	39	<100	16	19	8	0,7	7,7	191
4	16	<10	<100	-	-	6	0,6	8,1	163
7	<10	<10	689	60	296	15	0,7	10,5	217
15	77	-	289	14	81	12	1,6	3,4	120
16	114	96	-	13	63	12	1,8	2,9	42
17 +	119	115	-	-	-	-	2,5	3,2	17

Todesursache:

Septisch-toxisches Herz- Kreislaufversagen

4) K. Z., m, 19 J.

Anamnese:

Sturz aus dem 5. Stockwerk

Diagnosen:

- Schädel-Hirn-Trauma
- Thoraxtrauma mit Pneumothorax re.
- Mehrere Frakturen (LWK 2,3 und 5, Becken, Extremitäten)
- Stumpfes Bauchtrauma mit retroperitonealem Hämatom re. und intrarenalem Hämatom li. (Sonographie: Pankreas im Schwanzbereich etwas verdickt, keine größeren Traumafolgen erkennbar)
- Posttraumatische respiratorische Insuffizienz (kontrollierte maschinelle Beatmung)
- Akut anurisches Nierenversagen (Hämofiltration ab 19.Tag)

Laborwerte:

Tag	PLA U/l	LIP U/l	AMY U/l	GGT U/l	GPT U/l	CRE mg/dl	LEU /nl	THR /nl	
	pH 8,0	6,5							
5	13	-	229	42	-	79	1,0	11,0	79
21	304	-	1300	-	258	173	3,1	7,1	79
22	318	-	1598	50	224	141	3,6	9,5	79
23	230	-	-	-	280	160	3,3	12,5	88
24	73	-	600	-	258	173	4,1	16,2	112
27	112	-	966	-	236	65	3,7	20,0	136
28	365	-	871	39	174	49	3,6	19,3	127
29	555	426	990	28	173	39	3,3	10,1	143
30 +	690	575	619	-	-	-	3,8	3,9	134

Todesursache:

Septisch-toxisches Kreislaufversagen

5) S. A., w, 51 J.

Anamnese:

Verkehrsunfall

Diagnosen:

- Zahlreiche Frakturen (Wirbelsäule, Becken, Extremitäten)
- Intimaeinriß der Arteria renalis re. und weitere Verletzungen im Urogenitalbereich, im Verlauf: stumme Niere re., (Nierenfistel und Nephroureterektomie 7. Tag, maschinelle Hämofiltration)
- V.a. Hirnstammkontusion, im Verlauf: malignes Hirnödem (kontrollierte Beatmung)
- retroperitonealer Abszeß (Ausräumung am 17. Tag)

Laborwerte:

Tag	PLA U/l	LIP U/l	AMY U/l	GGT U/l	GPT U/l	CRE mg/dl	LEU /nl	THR /nl
	pH 8,0							
2	<10	<100	25	8	30	1,2	7,4	82
6	29	<100	-	-	-	1,1	4,9	91
8	258	<100	11	38	-	1,2	6,6	88
10	650	<100	7	-	-	2,4	9,9	138
13	50	183	-	-	-	1,8	11,0	99
16	36	219	16	161	86	1,3	7,1	153
21	490	-	-	76	102	2,3	8,0	251
22	690	-	-	-	67	2,7	7,7	205
23 +	470	171	9	46	64	2,5	3,8	113

Todesursache;

Septisch-toxisches Multiorganversagen

6) S. A., w, 80 J.

Anamnese:

Als Fußgängerin von einem Auto erfaßt

Diagnosen:

- Schädel-Hirn-Trauma
- Thoraxtrauma mit Rippenfrakturen und Lungenkontusion
- stumpfes Bauchtrauma
- Frakturen an Becken und unterer Extremität
- Posttraumatisch respiratorische Insuffizienz (kontrollierte maschinelle Beatmung)
- Akutes anurisches Nierenversagen

Todesursache:

Pulmonaler, renaler und kardiozirkulatorischer Funktionsverlust infolge der schweren Traumata

Laborwerte:

Tag	PLA		LIP	AMY	GGT	GPT	CRE	LEU	THR
	U/l		U/l	U/l	U/l	U/l	mg/dl	/nl	/nl
	pH	8,0	6,5						
2	11	-	450	113	15	54	0,9	9,6	42
3	<10	-	130	-	-	-	0,9	9,8	36
6	19	-	114	-	58	22	1,0	7,8	34
8	145	108	226	33	60	21	1,0	-	80
9	126	161	325	40	61	15	1,0	-	88
10	190	133	333	31	65	17	1,8	19,8	77
13 +	224	143	409	44	73	45	5,1	18,1	74

7) S. M., w, 93 J.

Anamnese:

Abdominelle Symptomatik

Diagnosen:

- Akutes Abdomen (Laparotomie)
- Akute Pankreatitis (intraoperativ ödematös verquollen; Drainage)
- Ovarial- und Leberzyste (Punktion)

Verlauf: Postoperativ komplikationsloser Verlauf

Laborwerte:

Tag	PLA		LIP	AMY	GGT	GPT	CRE	LEU	THR
	U/l		U/l	U/l	U/l	U/l	mg/dl	/nl	/nl
	pH	8,0	6,5						
1	117	-	7820	750	164	22	1,2	6,1	199
2	33	30	1600	218	-	13	-	5,9	203
3	30	43	300	84	-	9	0,9	6,7	244
6	18	-	333	26	-	-	-	-	255

8) SCH. A., w, 78 J.

Anamnese:

Mediale Schenkelhalsfraktur li.

Diagnosen:

- Z.n. medialer Schenkelhalsfraktur (Moore Prothese am 4. Tag)
- Euthyreote Struma Grad III mit massiven Verdrängungs- und Kompressionserscheinungen (subtotale Strumaresektion re. am 8. Tag)
- Lobärpneumonie re.
- Prä- und zunehmend postoperativ respiratorische Insuffizienz (maschinelle Beatmung)
- Oligo-anurisches Nierenversagen

Laborwerte:

Tag	PLA U/l	LIP U/l	AMY U/l	GGT U/l	GPT U/l	CRE mg/dl	LEU /nl	THR /nl
	pH 8,0	6,5						
5	102	53	<100	-	-	1,8	14,9	247
8	59	31	<100	12	-	1,8	21,0	330
10	142	-	<100	-	-	2,9	20,6	230
11	753	346	100	8	29	24	3,7	22,6
12	540	190	266	8	-	17	4,6	11,6
14 +	161	62	219	12	23	17	5,6	6,1

Todesursache:

Hypoxisch bedingtes Herz- Kreislaufversagen

Pathologie:

Bronchopneumonie re. und eingeschnitzener hämorrhagischer Infarkt im Sinne einer Infarktpneumonie des re. Unterlappens

9) SCH. A., m, 82 J.

Anamnese:

Einweisung ins Krankenhaus wegen zunehmender abdomineller Symptomatik

Diagnosen:

- Perforiertes Ulcus ventriculi (Excision und Übernähung)
- Vier-Quadranten-Peritonitis
- Ulcus duodeni
- Arterielle Hypertonie
- Chronisch obstruktive Lungenerkrankung und respiratorische Insuffizienz (kontrollierte maschinelle Beatmung)

Laborwerte:

Tag	PLA U/l	LIP U/l	AMY U/l	GGT U/l	GPT U/l	CRE mg/dl	LEU /nl	THR /nl
	pH 8,0	6,5						
26	31	-	232	33	-	2,0	23,4	216
29	78	67	<100	13	176	20	2,0	19,2
34	61	16	<100	-	128	12	1,8	26,0
36	<10	-	<100	-	-	-	1,8	24,5
38	86	-	<100	-	-	-	2,0	21,3
41	224	98	<100	-	139	17	2,3	21,7
43	170	87	<100	-	-	19	2,2	24,6
46 +	76	66	<100	-	-	-	2,5	24,5

Todesursache:

Hypodynames Herz- Kreislaufversagen

10) SCH. P., m, 25 J.

Anamnese:

Als Radfahrer von PKW angefahren

Diagnosen:

- Schädel-Hirn-Trauma
- Thoraxtrauma mit Lungenkontusion
- Abdominaltrauma (Übernähung der Lebereinsrisse; Sonographie am 24. Tag: Pankreas vergrößert, kein Anhalt für nekrotisierende Pankreatitis)
- Verzögerte Nierenruptur re. (Nephrektomie am 15. Tag, maschinelle Hämofiltration)
- Zahlreiche Frakturen
- Respiratorische Insuffizienz, Lungenversagen (kontrollierte Beatmung)
- Akutes Nierenversagen (maschinelle Hämofiltration)

Laborwerte:

Tag	PLA		LIP	AMY	GGT	GPT	CRE	LEU	THR
	U/1		U/1	U/1	U/1	U/1	mg/dl	/nl	/nl
	pH	8,0	6,5						
1	<10	-	<100	-	26	296	1,0	9,7	148
4	23	-	138	-	-	124	0,9	11,3	212
11	22	-	-	-	135	73	5,8	24,7	317
13	85	-	1107	62	-	49	5,0	30,1	405
14	67	-	757	44	452	117	4,7	24,5	384
19	<10	-	1238	80	294	62	4,2	20,0	387
27	<10	-	1107	79	-	67	3,4	28,1	399
31	116	180	259	-	-	-	2,5	11,7	180
32	205	239	139	17	131	91	2,5	11,6	180
35	53	41	350	35	196	66	2,0	19,5	118
37	27	22	449	-	-	-	2,5	24,5	95
39	52	52	343	28	136	42	2,0	17,5	110
40 +	139	159	202	-	116	41	1,4	6,8	66

Todesursache:

Toxisch-hypoxisches Herz-Kreislaufversagen

Pathologie:

Schock- und Beatmungslunge, Bronchopneumonie mit Abszeßbildung

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Aarsman A.J., Mynbeek G., van den Bosch H., Rothhut B., Prieur B., Comera C., Jordan L., Russo-Marie F. (1987)
Lipocortin inhibition of extracellular and intracellular phospholipases A₂ is substrate concentration dependent
Febs Letters 219: 176-180
- 2) Alonso F., Henson P.M., Leslie C.C. (1986)
A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonyl-containing phosphatidylcholine
Biochim. Biophys. Acta 878: 273-280
- 3) Becker A., Königsmann W., Junge W. (1986)
Untersuchungen zur Spezifität des Phospholipasetests
Klin. Chem. Mitt. 4: 205-207
- 4) Bokay A.Z. (1877)
Über die Verdaulichkeit des Nucleins und Lecithins
Z. Physiol. Chem. 1: 157-164
- 5) Bradford M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding
Anal. Biochem. 72: 248-254
- 6) Brand L., Gohlke J.R. (1972)
Fluorescence probes for structure
Ann. Rev. Biochem. 41: 843-868
- 7) Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H. (1983)
Dermatologie und Venerologie
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio
- 8) Chang J., Musser J.H., McGregor H. (1987)
Phospholipase A₂: Function and Pharmacological Regulation
Biochem. Pharm. 36: 2429-2436
- 9) Chien K.R., Han A., Sen A. (1984)
Accumulation of Unesterified Arachidonic Acid in Ischemic Canine Myocardium
Circ. Res. 54: 313-315

- 10) Cloix J.F., Colard O., Rothhut B., Russo-Marie F. (1983)
Characterization and partial purification of 'renocortins': two Polypeptides formed in renal cells causing the anti-phospholipase-like action of glucocorticoids
Br. J. Pharmac: 79: 313-321
- 11) Davidson F.F., Dennis E.A., Powell M., Glenney Jr J.R. (1987)
Inhibition of Phospholipase A₂ by "Lipocortins" and Calpactins
J. Biol. Chem. 262: 1689-1705
- 12) De Haas G.H., Postema N.M., Nieuwenhuizen W., van Deenen L.M.N. (1968)
Purification and Properties of Phospholipase A from Porcine Pancreas
Biochim. Biophys. Acta 159: 103-117
- 13) De Haas G.H., Postema N.M., Nieuwenhuizen W., van Deenen L.M.N. (1968)
Purification and Properties of an Anionic Zymogen of Phospholipase A from Porcine Pancreas
Biochim. Biophys. Acta 159: 118-129
- 14) Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie: Bericht über das 3. interdisziplinäre Kolloquium über biochemische und klinische Aspekte der Phospholipase A (1987)
Klin. Chem. Mitt. 4: 196-223
- 15) De Winter J.M., Vianen G.M., van den Bosch H. (1982)
Purification and Properties of Rat Liver Mitochondrial Phospholipase A₂
Biochim Biophys Acta 712: 332-341
- 16) Edgar A.D., Strosznajder J., Horrocks L.A. (1982)
Activation of Ethanolamine Phospholipase A₂ in Brain During Ischemia
J. Neurochem. 39: 1111-1115
- 17) Elsbach P., Weiss J., Franson R.C., Beckerdite-Quagliata S., Schneider A., Harris L. (1979)
Separation and Purification of a Potent Bactericidal Permeability-Increasing Protein and a Closely Associated Phospholipase A₂ from Rabbit Polymorphonuclear Leucozytes
J. Biol. Chem. 254: 11000-11009

- 18) Escola J.U., Nevalainen T.J., Ako H.J. (1983)
Purification and Characterization of Human Pancreatic Phospholipase A₂
Clin. Chem. 29: 1772-1776
- 19) Escola J.U., Nevalainen T.J., Lövgren T.N. (1983)
Resolved Fluoroimmunoassay of Human Pancreatic Phospholipase A₂
Clin. Chem. 29: 1777-1780
- 20) Figarella C., Ribeiro T. (1971)
The Assay of Human Pancreatic Phospholipase A in Pancreatic Juice and Duodenal Contents
Scand. J. Gastroent. 6: 133-137
- 21) Flower R., Blackwell G.J. (1979)
Anti-inflammatory Steroids Induce Biosynthesis of Phospholipase A-2 Inhibitor which Prevents Prostaglandin Generation
Nature 278: 465
- 22) Flower R.J., Wood J.N., Parente L. (1984)
Macro cortin and the Mechanism of Action of the Glucocorticoids
Adv. Infl. Res. 7: 61-70
- 23) Fluka (1986/87)
Katalog 15
Chemika-BioChemika
- 24) Franson R., Weiss J., Martin I., Spitznagel J.K., Elsbach P. (1977)
Phospholipase A Activity Associated with the Membranes of Human Polymorphonuclear Leukocytes
Biochem. J. 167: 839-841
- 25) Gattaz W.F., Köllisch M., Thuren T., Virtanen J.A., Kinnunen P.K.J. (1987)
Increased Plasma Phospholipase-A₂ Activity in Schizophrenic Patients: Reduction after Neuroleptic Therapy
Biol. Psychiatry 22: 421-426
- 26) Grataroli R., De Caro A., Guy O., Amic J., Figarella C. (1981)
Isolation and Properties of Phospholipase A₂ from Human Pancreatic Juice
Biochimie 63: 677-684

- 27) Grataroli R., Dijkman R., Dutilh C.E. (1982)
Studies on Phospholipase A₂ and its Enzyme from
Human Pancreatic Juice
Eur. J. Biochem. 122: 111-117
- 28) Greiling H., Gressner A.M. (1987)
Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York
- 29) Hendrickson H.S., Rauh P.N. (1981)
Continuous Fluorometric Assay of Phospholipase A₂ with
Pyrene-Labeled Lecithin as a Substrate
Anal. Biochem. 116: 553-558
- 30) Hendrickson H.S., Hendrickson E.K., Dybvig R.H. (1983)
Chiral Synthesis of a Dithiolester Analog of Phosphatidylcholine as a Substrate for the Assay of Phospholipase A₂
J. Lipid Res. 24: 1532-1537
- 31) Hiefinger R., Schreiber R., Weiss L. (1986)
Erhöhte Phospholipase A-Aktivität im Serum von Patienten mit Autoimmunerkrankungen
Klin. Chem. Mitt. 4: 222-223
- 32) Hiefinger R., Schreiber R., Weiss (1987)
Persönliche Mitteilung
- 33) Hiefinger R., Samtleben W., Hoffmann G.E. (1987)
Phospholipase-A-Aktivität im Serum von Patienten mit Autoimmun- und Immunkomplexerkrankungen
Klin. Chem. Mitt. 5: 231-232
- 34) Hirata F., Del Carmine R., Nelson C.A., Axelrod J., Schiffmann E., Warabi A., De Blas A.L., Nirenberg M., Manganiello V., Vaughan M., Kumagai S., Green I., Decker J.L., Steinberg A.D. (1981)
Presence of autoantibody for phospholipase inhibitory protein, lipomodulin, in patients with rheumatic diseases
Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3190-3194
- 35) Hirata F. (1984)
Roles of Lipomodulin: A Phospholipase Inhibitory Protein in Immunoregulation
Adv. Infl. Res. 7: 71-78

- 36) Hoffmann G.E., Weiss L., Wieland O.H. (1978)
Measurement of ATP-Citrate-Lyase and Acetyl-CoA-Synthetase Activity Using Arylamine Acetyltransferase
Anal. Biochem. 84: 441-448
- 37) Hoffmann G.E., Schmidt D., Hoffmann S. (1985)
Verlaufskontrolle der akuten Pankreatitis: Stellenwert der Pankreasenzyme
Diagnose & Labor 2: 56-61
- 38) Hoffmann G.E., Schmidt D., Bastian B. (1985)
Bestimmung der Phospholipase A bei akuter Pankreatitis
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23: 582-583
- 39) Hoffmann G.E., Neumann U., Hoffmann S., Kaspar P., Weiss L. (1986)
An Enzymatic Method for Calibration of Serum Lipase Assays
Clin. Chem. 32: 545-547
- 40) Hoffmann G.E. (1986)
Phospholipase A - biochemische Grundlagen und klinische Bedeutung
Klin. Chem. Mitt. 4: 196-201
- 41) Hoffmann G.E., Schmidt D., Staffa F., Bastian B. (1986)
Entwicklung einer photometrischen Bestimmungsmethode für Phospholipase A
Klin. Chem. Mitt. 4: 201-205
- 42) Hoffmann G.E., Schmidt D., Bastian B., Guder W.G. (1986)
Photometric determination of Phospholipase A
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 24: 871-876
- 43) Hoffmann G.E., Kozumplik V., Beck R., Kellermann W. (1987)
Rapid Determination of Phospholipase A in Human Serum and Plasma
Clin. Chem. 33: 1259
- 44) Hofmann W., Guder W.G. (1987)
Adaption eines immunturbidimetrischen Testes zur Albuminbestimmung im Urin an das Analysengerät Kone Progress
Ärztl. Lab. 33: 229-232

- 45) Hostetler K.Y. (1985)
The Role of Phospholipases in Human Diseases
In "Phospholipids and Cellular Regulation" (Kuo, J.F.
ed.) Vol.I: 181-206
CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- 46) Kasurinen J., Vanha-Pertula T. (1987)
An Enzymatic Colorimetric Assay of Calcium-Dependent
Phospholipase A
Anal. Biochem. 164: 96-101
- 47) Karlson P. (1980)
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Thieme-Verlag, Stuttgart, New York
- 48) Kelder G.M., Hille J.D., Dijkman R., de Haas G.H.,
Egmond M.R. (1981)
Binding of Porcine Pancreatic Phospholipase A₂ to
Various Micellar Substrate Analogues. Involvement of
Histidine-48 and Aspartic Acid-49 in the Binding
Process
Biochemistry 20: 4074-4078
- 49) Klotz I.M. (1970)
Comparison of molecular structures of proteins: helix
content; distribution of apolar residues
Arch. Biochem. Biophys. 138: 704-706
- 50) Koeniger R., Staffa F., Hoffmann G.E. (1986)
Automated analysis of phospholipase A activity in serum
of intensive care patients
Fresenius Z. Anal. Chem. 324: 308
- 51) Koeniger R., Schmidt Th.-O., Hoffmann G.E. (1986)
Phospholipase A im Serum - ein Indikator für die
Prognose operativer Intensivpatienten
Klin. Chem. Mitt. 4: 220-223
- 52) Koeniger R., Schmidt Th.-O., Hoffmann G.E. (1987)
Phospholipase A und posttraumatisches Lungenversagen
Klin. Chem. Mitt. 5: 235-238
- 53) Kozumplik V., Hoffmann G.E. ((1987)
Isolierung von Phospholipase A₂ aus Duodenalsaft
Klin. Chem. Mitt. 5: 238-240

- 54) Levin S.W., Butler J.D., Schuhmacher U.K., Wightman P.D., Mukherjee A.B. (1986)
Uteroglobulin Inhibits Phospholipase A₂ Activity
Life Sciences 38: 1813-1819
- 55) Löffler G., Petrides P.E., Weiss L., Harper H.A. (1979)
Physiologische Chemie
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 56) Magee W.L., Gallai-Hatchard J., Sanders H., Thomson R.H.S. (1961)
Phospholipase A from Human Pancreas
Biochem. J. 83: 17-25
- 57) Masliah J., Kadiri C., Pepin D., Rybkine T., Etienne J., Chambaz J., Bereziat G. (1987)
Antigenic relatedness between phospholipases A₂ from Naja naja venom and from mammalian cells
Febs Letters 222: 11-16
- 58) Miva M., Kubota I., Ichihashi T., Motojima H., Matsumoto M. (1984)
Studies on Phospholipase A Inhibitor in Blood Plasma
I. Purification and Characterization of Phospholipase A Inhibitor in Bovine Plasma
J. Biochem. 96: 761-773
- 59) Nalbone G., Charbonnier-Augeire M., Lafont H., Grataroli R., Vigne J., Lairon D., Chabert C., Leonardi J., Hauton J.C., Verger R. (1983)
Adsorption of pancreatic (pro)phospholipase A₂ to various physiological substrates
J. Lip. Res. 24: 1441-1450
- 60) Nevalainen T. (1980)
The Role of Phospholipase A in Acute Pankreatitis
Scand. J. Gastroent. 15: 641-650
- 61) Nevalainen T., Eskola J., Aho A., Havia V., Lövgren T., Nântö V. (1985)
Immunoreactive phospholipase A₂ in serum in acute pancreatitis and pancreatic cancer
Clin. Chem. 31: 1116-1120

- 62) Nishijima J., Okamoto M., Ogawa M., Kosaki G., Yamano T. (1983)
Purification and Characterization of Human Pancreatic Phospholipase A₂ and Development of a Radioimmunoassay
J. Biochem. 94: 137-147
- 63) Offenbach G., Pinta P., Masliah J. (1981)
Phospholipasic and Prophospholipasic Activities in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Severe Acute Pulmonary Disease with or without ARDS
Intensive Care Med. 7: 285-290
- 64) Parente L., Flower R.J. (1985)
Glucocorticoid-Induced Antiphospholipase Proteins In Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism (W. Lands, ed.) Martinus Nijhoff Publishing, Boston
- 65) Pharmacia (1979)
Octyl-Sepharose CL-4B Phenyl-Sepharose CL-4B (Informationsheft hydrophobe Chromatographie)
- 66) Pharmacia (1985)
Calibration Kits for Molecular Weight Determination using Electrophoresis (Arbeitsanleitung)
- 67) Pharmacia (1985)
Gel filtration theory and practice (Informationsheft Molekularsieb)
- 68) Pharmacia (1985)
Gel Filtration Calibration Kit Instruction Manual (Arbeitsanleitung)
- 69) Pharmacia (1986)
Ion Exchange Chromatography (Informationsheft Ionenaustauscher)
- 70) Poensgen J. (1987)
Persönliche Mitteilung
- 71) Pruzanski W., Vadas P., Stefanski E., Urowitz M.B. (1985)
Phospholipase A₂ Activity in Sera and Synovial Fluids in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. Its possible Role as a Proinflammatory Enzyme
J. Rheumatol. 12: 211

- 72) Pschyrembel (1982)
Klinisches Wörterbuch
De Gruyter, Berlin, New York
- 73) Puijk W.C., Verheij H.M., De Haas G.H. (1977)
The Primary Structure of Phospholipase A₂ from Porcine
Pancreas. A Re-investigation
Biochim. Biophys. Acta 492: 254-259
- 74) Read S.M., Northcote D.H. (1981)
Minimization of Variation in the Response to Different
Proteins of the Coomassie Blue G Dye-Binding Assay for
Protein
Anal. Biochem. 116: 53-64
- 75) Richterich R., Colombo J.P. (1978)
Klinische Chemie
S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York,
Sydney 4. Auflage
- 76) Rothhut B., Russo-Marie F., Wood J., DiRosa M., Flower
R.J. (1983)
Further characterization of the glucocorticoid-induced
antiphospholipase protein "renocortin"
Biochem. Biophys. Res. Comm. 117: 878-884
- 77) Rothhut B., Comera C., Prieur B., Errasfa M., Minassian
G., Russo-Marie F. (1987)
Purification and characterization of a 32-kD phospho-
lipase A₂ inhibitory protein (lipocortin) from human
peripheral blood mononuclear cells
Febs Letters 219: 169-175
- 78) Russo-Marie F. (1986)
La lipocortine, protéine e contrôle de l'activation
membranaire dans la reaction inflammatoire
Path. Biol. 34: 227-233
- 79) Schmidt D., Hoffmann G.E. (1986)
Serumaktivitäten von Lipase und Phospholipase A bei
pankreatischen und extrapankreatischen Erkrankungen
Klin. Chem. Mitt. 4: 217-219
- 80) Schmidt D., Hoffmann G.E. (1987)
Activity of Phospholipase A Compared in Serum of
Patients with Pancreatic and Nonpancreatic Diseases
Clin. Chem. 4: 594-596

- 81) Schröder T., Kinnunen P.K.J., Lempinen M. (1978)
Xylocaine Treatment in Experimental Pancreatitis in Pigs
Scand. J. Gastroent. 13: 863-865
- 82) Schröder T., Kivilaakso E., Kinnunen P., Lempinen M. (1980)
Serum Phospholipase A₂ in Human Pancreatitis
Scand. J. Gastroent. 15: 633-636
- 83) Shakir K.M. (1981)
Phospholipase A₂ Activity of Post-Heparin Plasma: a Rapid and Sensitive Assay and Partial Characterization
Anal. Biochem. 114: 64-70
- 84) Shipolini A., Callewaert G.L., Cottrell R.L., Doonan S., Vernon C.A., Banks B.E. (1971)
Phospholipase A from Bee Venom
Eur. J. Biochem. 20: 449-468
- 85) Sipka S., Gergely P., Farkas T., Dinya Z., Szegedi G (1988)
Persönliche Mitteilung
- 86) Slotboom A.J., Verheij H.M., De Haas G.H. (1982)
On the Mechanism of Phospholipase A₂
In Phospholipids (Hawthorne & Ansell eds.), Elsevier Biomedical Press pp. 359-434
- 87) Sobel B.E., Corr P.B., Robinson K.A., Goldstein R.A., Witkowski F.X., Klein M.S. (1978)
Accumulation of Lysophosphatides with Arrhythmogenic Properties in Ischemic Myocardium
J. Clin. Invest. 62: 546-550
- 88) Staffa F. (1987)
Eigenschaften der Phospholipase A aus Pankreas und Leukozyten des Menschen
Dissertation Universität München (im Druck)
- 89) Stefanski E., Pruzanski W., Sternby B., Vadas P. (1986)
Purification of a Soluble Phospholipase A₂ from Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis
J. Biochem. 100: 1297-1303
- 90) Steffens P. (1987)
Hydrophobe Interaktionschromatographie
Pharmacia aktuell 2: 2-5

- 91) Teschner M., Schaefer R.M., Penzel W., Heidland A.
(1987)
Serum Phospholipase A-Aktivität als prognostischer
Indikator bei septischen Patienten
Klin. Chem. Mitt. 5: 232-235
- 92) Thomas L. (1984)
Labor und Diagnose
Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg/Lahn
- 93) Thuren T., Virtanen J.A., Lalla M., Kinnunen P.K.J.
(1985)
Fluorometric Assay for Phospholipase A₂ in Serum
Clin. Chem. 31: 714-717
- 94) Unanue E., Benacerraf B. (1987)
Immunologie
De Gruyter, Berlin, New York
- 95) Vadas P. (1984)
Elevated Plasma Phospholipase A₂ Levels: Correlation
with the Hemodynamic and Pulmonary Changes in Gram-
Negative Septic Shock
J. Lab. Clin. Med. 104: 873-881
- 96) Vadas P., Pruzanski W. (1986)
Role of Secretory Phospholipases A₂ in the Pathobiology
of Disease
Lab. Invest. 55: 391-404
- 97) Van den Bosch H., Aarsman A.J. (1979)
A Review on Methods of Phospholipase A Determination
Agents and Actions 9: 382-389
- 98) Verheij H., Westerman J., Sternby B., De Haas G.H.
(1983)
The Complete Primary Structure of Phospholipase A₂ from
Human Pancreas
Biochim. Biophys. Acta 747: 93-99
- 99) Victor M., Weiss J., Klempner M.S., Elsbach P. (1981)
Phospholipase A₂ Activity in the Plasma Membrane of
Human Polymorphonuclear Leucocytes
FEBS 36: 298-300

- 100) Waite M. (1985)
Approaches to the study of mammalian cellular phospholipases
J. Lip. Res. 26: 1379-1388
- 101) Wako Chemicals (1987)
In vitro Enzymatic Colorimetric Method for the Quantitative Determination of Non-Esterified (or Free) Fatty Acids (NEFA or FFA) in Serum
(Informationsmaterial zum NEFA-C-Test)
- 102) Walsh C.E., Dechatelet L.R., Chilton F.H. et al. (1983)
Mechanism of Arachidonic Acid Release in Human Polymorphonuclear Leukocytes
Biochim. Biophys. Acta 750: 32-40
- 103) Yamamoto A., Adachi S., Ishikawa K., Yokomura T., Kitani T., Nasu T., Imoto T., Nishikawa M. (1971)
Studies on Drug-Induced Lipidosis
J. Biochem. 70: 775-780
- 104) Zieve L., Vogel W.C. (1961)
Measurement of Lecithinase A in Serum and Other Body Fluids
J. Lab. Clin. Invest. 57: 586-599
- 105) Zöch G., Roth E., Hölbling N., Karner J., Funovics J., Czerwenka K. (1984)
Effekt von p-Bromophenacylbromid, einem Phospholipase A-Hemmer, bei experimenteller akuter Pankreatitis der Ratte
Res. Exp. Med. 184 179-189

8. DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. W. Guder (Institut für Klinische Chemie, Städtisches Krankenhaus München-Bogenhausen) in der Zeit von Februar 1987- Februar 1988 durchgeführt. Herrn Prof. Dr. W. Guder danke ich für die fundierte fachliche Förderung und großzügige Aufnahme als Doktorand in sein Institut.

Mein besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Dr. med. G. Hoffmann für die wissenschaftliche Führung und zahlreiche wertvolle Ratschläge.

Frau Dr. med. R. Hiefinger und Herrn Dr. med. V. Kozumplik danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit innerhalb der Phospholipase-A-Arbeitsgruppe.

Mein Dank gilt ferner allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie für ihre Unterstützung sowie Herrn Oberarzt Dr. med. Th.-O. Schmid der anästhesiologischen Intensivstation und der II. Medizinischen Abteilung des Hauses für die Überlassung von Patientenseren.

Weiterhin danke ich Frau Dr. J. Poensgen (Firma Grünenthal) für ihre Hilfestellung bei der Durchführung eines Isotopentests, Herrn Prof. Dr. T. Nevalainen (Pathologische Abteilung der Universität Turku), und Herrn Privatdozent Dr. M. Meurer (Dermatologische Universitätsklinik, München) für die Zusendung von im Text aufgeführten Materialien und Proben.

Der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich für die Förderung der vorliegenden Arbeit durch ein Doktorandenstipendium danken.

9. LEBENSLAUF

Am 5. Oktober 1960 wurde ich, Korbinian Brand, als Sohn des damaligen Oberstudienrats, jetzigen Studiendirektors i.R. und früheren Hochschullehrbeauftragten Theo Brand und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Glas, Studienrätin bis 1959, in München geboren.

1967 bis 1971 Volksschule St. Georg in Freising.

1971 bis 1980 Camerloher-Gymnasium in Freising.

Juni 1980 Abitur in Freising.

November 1980 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München.

August 1982 Ärztliche Vorprüfung

März 1984 1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

August 1985 2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Oktober 1985 bis September 1986 Praktisches Jahr in Innerer Medizin, Chirurgie und Dermatologie in München.

Herbst 1986 3.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

7.Januar 1987 Approbation als Arzt.

Seit November 1986 Studium der Informatik an der Technischen Universität München.

Februar 1987 bis Februar 1988 Doktorand (Stipendium der LMU-München) am Institut für Klinische Chemie (Prof. Dr.med.W.Guder) des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen (Akademisches Lehrkrankenhaus).

Seit Februar 1988 Assistenzarzt am Städtischen Krankenhaus München-Bogenhausen im Bereich Medizinische Informatik.

